

DOCKET NO.: 216127US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Haruya SATO et al.  
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION  
FILED: HERewith  
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/04362  
INTERNATIONAL FILING DATE: June 30, 2000  
FOR: METHOD FOR SCREENING TARGETING DDS PREPARATION

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	11-186761	30 June 1999

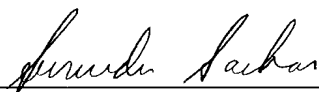
Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/04362. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

  
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



JP00/4362  
日 本 国 特 許 庁PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 18 AUG 2000

WIPO

PCT

4  
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月30日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第186761号

出 願 人

Applicant (s):

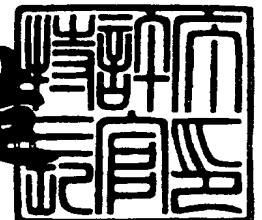
味の素株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3060368

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 PA430250  
 【提出日】 平成11年 6月30日  
 【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿  
 【国際特許分類】 A61K

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社中央研究所内

【氏名】 佐藤 晴哉

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社中央研究所内

【氏名】 高原 義之

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社中央研究所内

【氏名】 林 永子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社医薬研究所内

【氏名】 田畑 智之

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社医薬研究所内

【氏名】 鈴木 学

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市永池 1 4 3 7

【氏名】 杉山 雄一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都清瀬市中清戸5-83-8 サンヒルズ101号

【氏名】 加藤 将夫

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代表者】 江頭 邦雄

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ターゲティング型DDS製剤のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的組織に対するターゲティング型DDS製剤をスクリーニングする方法において、標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又は当該リガンドで修飾された物質を、当該レセプターへの結合を介した内在化回避能と結合親和性の強さを指標としてスクリーニングする方法。

【請求項2】 特定のレセプターへの結合を介した内在化回避能が、当該レセプターに対する解離速度定数 ( $k_{off}$ ) と内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) との比 ( $k_{off}/k_{int}$ ) であり、結合親和性の強さが解離定数 ( $K_d$ ) の逆数 ( $1/K_d$ 、ただし  $K_d$  は  $k_{off}$  と結合速度定数 ( $k_{on}$ ) の比) である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 レセプターに対する解離速度定数 ( $k_{off}$ ) と内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) との比 ( $k_{off}/k_{int}$ ) が、1以上であるリガンド又は当該リガンドで修飾された物質をスクリーニングする請求項2に記載の方法。

【請求項4】 レセプターに対する解離定数 ( $K_d$ ) が10mM以下であるものをスクリーニングする請求項2又は3に記載の方法。

【請求項5】 レセプターに対する内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) のできるだけ小さいものをスクリーニングする請求項4に記載の方法。

【請求項6】 レセプターに対する内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) が、 $0.1 \text{ min}^{-1}$  より小さいものである請求項5に記載の方法。

【請求項7】 標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプターが、アシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) である請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 標的組織が、肝臓である請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 細胞膜上に存在する特定のレセプター又は抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセ

プターを発現する遊離細胞または培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質を洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化リガンドの結合量が、当該親和性リガンドそのものの非標識体を初期に添加した場合の結合量に比べて高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 細胞膜上に存在する特定のレセプターが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアジアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアジアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対し 10 mM 以下の解離定数 ( $K_d$ ) となる結合親和性を有する請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】 細胞膜上に存在する特定のレセプターに対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプターを発現する遊離細胞または培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質をキレート剤入りのバッファー又は酸性バッファーで洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化されたりガンドの結合量が、レセプター結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が 1 以上であるリガンドを添加した場合の結合量に比べ高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】 レセプター結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が 1 以上であるリガンドが、3 分枝型ガラクトースリガンド ( $(Gal)_3$ ) である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 細胞膜上に存在する特定のレセプターが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアジアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) である請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】 リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対し、10 mM以下の解離定数 ( $K_d$ ) となる結合親和性を有する請求項 12~14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】 標識化が、ラジオアイソトープラベルあるいは蛍光ラベルである請求項 9~15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】 リガンドが糖又はその誘導体である請求項 1~16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】 リガンドで修飾された物質が生理活性蛋白質である請求項 1~17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】 生理活性蛋白質がインターロイキン 2 またはインターフェロン  $\alpha$  あるいはインターフェロン  $\beta$  である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】 請求項 1~19 のいずれかに記載の方法を行うことができる装置。

【請求項 21】 請求項 1~19 のいずれかに記載の方法を行うための試薬キット。

【請求項 22】 請求項 1~19 のいずれかに記載の方法でスクリーニングされたターゲティング型 DDS 製剤に適したリガンド。

【請求項 23】 請求項 1~19 のいずれかに記載の方法でスクリーニングされたターゲティング型 DDS 製剤に適したリガンドを有する生理活性物質、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

【請求項 24】 生理活性物質が生理活性蛋白質である請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】 リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対し結合親和性を保持したリガンドであって、その肝細胞への解離速度定数 ( $k_{off}$ ) と内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) との比 ( $k_{off}/k_{int}$ ) が 1 より大きいことから肝細胞外液中での滞留性を有する肝認識リガンドである請求項 23 又は 24 に記載の医薬品組成物。

【請求項 26】 リガンドが、肝実質細胞表面特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対する結合親和性の強さの指標である



解離定数  $K_d$  値が 10 mM 以下で、かつ内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) が  $0.1 \text{ min}^{-1}$  より小さく、 $k_{off}/k_{int}$  比が 1 より大きい速度論的性質を有する肝認識リガンドである請求項 25 に記載の医薬品組成物。

【請求項 27】 リガンドが、分岐したガラクトース (Gal)、N-アセチルガラクトサミン (GaNAc) あるいはその誘導体である請求項 23～26 のいずれかに記載の医薬品組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞膜上の特定レセプター周辺への集積性及び滞留性を有するリガンドを、レセプターとの結合親和性及びレセプターを介した細胞内への内在化回避能を指標としてスクリーニングする方法、ならびにそのリガンドと生理活性蛋白質あるいは低分子薬物との結合体であるレセプター周辺への集積、滞留能を有する医薬品組成物に関する。

また、本発明は本発明のスクリーニング方法により、ターゲティング型 DDS 製剤を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、遺伝子組換え技術を利用した生産により種々の生理活性蛋白質の医薬品開発が試みられてきたが、その実用化は非常に困難であった。生理活性蛋白質は微量で強い生理活性を示し、生理学的には標的部位で局所的に作用し、目的とした治療効果を奏した後は速やかに消失することが望まれていた。しかし、一般に投与された薬物は一部は目的とする作用部位に到達して治療効果を示すが、他の多くは他の組織にも分布し、代謝、排泄される。この過程で少なからず副作用を示すことになるが、標的部位に必要量到達させるためにはある程度以上の大量投与をしなければならなかった。さらに、(1) 生理活性蛋白質が生体内で酵素により分解され易く、血中滞留性が低い為に大量投与が必要であること、(2) 多様な生理活性をもち標的指向性が低いために、大量投与した場合、標的以外の臓器あるいは細胞周辺への分布により重篤な副作用が生じてくるなどの問題があっ

た。

#### 【0003】

このような問題点を解決する最も有効な方法として、生理活性蛋白質による最適な治療効果を得る為に、薬物を目的とする作用の発現すべき部位に、必要な量、必要な時間、選択的に送り込みことを目的とした薬物投与形態、即ちドラッグデリバリーシステム（DDS、薬物送達システム）の重要性が強く認識されるようになった。この中で特に、薬物を標的部位に選択的に移行させるターゲティング（標的指向化）は、有効な薬物治療を行なう上での必須条件であった。薬物送達システム（DDS）により、生理活性蛋白質の体内動態を制御することにより標的臓器あるいは細胞へ集積させるターゲティング型DDS（T-DDS）が、生理活性蛋白質による治療において注目されてきている。

#### 【0004】

しかしながら、現時点におけるT-DDSの成功例は、インターロイキン-2レセプター（IL-2R）を発現しているT細胞皮膚リンパ腫選択的な攻撃が可能なIL-2-ジフテリア毒素融合蛋白質のみであり（米国において医薬品認可済。Nichols J, et al., Eur J Cancer, 33(1), 34-36 (1997)）、より応用性の高い臓器特異的なDDSは成功していなかった。

また、親油性抗がん剤SMANCS（合成高分子スチレンマレイン酸コポリマーと蛋白質系抗がん剤ネオカルチノスタチンとの結合体）／リピオドール（油系造影剤）の複合製剤の肝動脈内投与によって肝臓中の腫瘍組織に徐々に侵出し、肝臓癌を治療する方法も報告されている（Oncologia, 15: 9-104 (1995)）が、このような局所投与による特殊な方法ではなく、全身投与による頻回投与が可能で、幅広い肝疾患用薬物（特に蛋白質系）に応用可能な肝臓ターゲティング法の開発が望まれている。

#### 【0005】

特に、ウイルス性肝炎や肝硬変、肝癌などに対する肝疾患治療用生理活性蛋白質の肝臓ターゲティング型DDSの確立については種々の検討が行なわれたものの、元来肝臓が物質の代謝、分解等の機能を有している為、集積した蛋白質がすぐに分解されてしまい、肝局所で生理活性を発現させることは困難であった。

一方、本発明者らは、肝実質細胞特異的に発現しているアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対する結合親和性が、天然糖鎖型リガンド (アシアロオロソムコイド) に比べ低いリガンドを肝認識素子として利用することにより、肝集積後の生理活性蛋白質が細胞内への取り込みによる分解をある程度回避しうることを見出した。実際、蛋白質修飾酵素であるトランスグルタミナーゼを用いて調製したインターロイキン-2 (IL-2) と合成低親和性リガンド (例えば、3分枝型ガラクトースリガンド (以下、(Gal)<sub>3</sub> という。)) との1対1ハイブリッド体は、肝集積性を示し、且つ肝実質細胞に取り込まれにくく、マウス肝癌モデルにおいて未修飾体に比べ強く腫瘍縮小させるとの知見を得、生理活性蛋白質の肝臓ターゲティングを可能にする、ASGP-Rに対する低親和性リガンド修飾生理活性蛋白質に関する特許を出願した (特願平8-273922号)。

## 【0006】

血漿糖蛋白質の肝への取り込みを担っているASGP-Rは、糖鎖末端の分枝したガラクトース (以下、Gal という。) あるいはN-アセチルガラクトサミン (以下、GalNAc という。) を認識して結合した後、エンドサイトーシスにより細胞内へ糖蛋白質を取り込み、分解することが知られている (Ashwell G. and Harford J., Annu.Rev.Biochem., 75(3): 531-554(1982))。これまでGalを分枝させたりガンドの結合親和性をできるだけ高めることにより細胞内へ選択的に薬物を取り込ませる試みに関して多数報告されているが (Wu G.Y., et al., J.Biol.Chem., 263: 4429-4432(1987); Merwin J.R. et al., Bioconjugate Chem., 5: 612-620 (1994))、本発明者らのような低親和性リガンドを用いた例はまったく行なわれていなかった。

本発明者らのASGP-Rに対する低親和性リガンドを用いた修飾による生理活性蛋白質は、全身投与における生理活性蛋白質の肝臓集積と薬理作用発現を可能にした世界で初めての例であった。

## 【0007】

しかしながら、本発明者らの低親和性リガンド修飾生理活性蛋白質、例えば、3分枝型ガラクトースリガンド修飾インターロイキン2 (以下、(Gal)<sub>3</sub>-

IL-2という。)のマウス静脈内投与後の肝臓中及び血漿中の濃度の推移をELISAによって測定した結果を見てみると、時間経過と共にその濃度が低下することが判明した。(Gal)<sub>3</sub>-IL-2の全身消失を決める臓器が主に肝臓であることを考えると、これらの結果は(Gal)<sub>3</sub>による修飾によってもIL-2の肝臓における消失抑制効果が不十分であることを示している。即ち、ASGP-Rへの結合により肝臓へ集積した(Gal)<sub>3</sub>-IL-2の一部は取り込みによる分解を回避するものの、一部は肝実質細胞内へエンドサイトーシスにより取り込まれ、分解されてしまっていると考えられる。

【0008】

したがって、標的臓器のレセプターに対する親和性のみをパラメーターとした修飾ではターゲティング型DDSとしては不十分であり、ターゲティング型DDSとするためにはさらに改善する必要があることが判明した。特に、リガンドを標的としたDDSを完成させる為には、ASGP-Rのような細胞膜上の特定レセプターに対し内在化をできるだけ回避させる為の理論を構築し、その理論をもとにしたリガンドスクリーニング法を開発する必要があることがわかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、全身投与後、ASGP-Rなどの細胞膜上の特定なレセプターへの結合親和性によってその周辺に集積させ、レセプターを介した内在化をできるだけ回避することにより標的組織に特異的に蓄積し得るリガンドの特性を把握し、当該リガンド特性を指標に、細胞内への内在化を回避できるリガンドをスクリーニングする方法を開発し、最適化されたりガンドを見出すことにある。さらに最適リガンドと生理活性蛋白質とを共有結合で結合させることにより、蛋白質のレセプター周辺への集積及び滞留を可能にする組織ターゲティング型DDS製剤を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、生理活性蛋白質などの薬物が標的組織において特異的に蓄積し得るためには、標的組織における特定のレセプターに対する結合親和性を有する

リガンドが標的組織の細胞に内在化されるのを回避できる能力を有することとかつ適度な結合親和性の強さを有することという相反する条件（内在化回避能が高いと  $k_{off}$  の値が大きくなり、結合親和性が低くなることになる）がバランスされていることが重要であることを見出した。特に、生理活性蛋白質などの薬物が標的組織の細胞を直接標的とするものではなく標的細胞周辺の免疫細胞系の賦活化などにより病巣部の治療を目的とするものである場合あるいは標的レセプターへのターゲティングにより標的組織上の別のレセプターを介して生理作用を発揮させることを目的とする場合には、生理活性蛋白質などの薬物が標的組織の細胞に対する特異的な親和性は有しているが、当該細胞に急速に取り込まれないことが活性の持続に重要な要因であることを見出した。とりわけ、標的組織が化学物質の代謝を司る肝臓の場合には、肝実質細胞に薬物が急速に取り込まれると肝実質細胞により速やかに分解、代謝され、薬物の肝臓集積率を如何に高めても活性の持続時間は非常に短いということになる。

## 【0011】

したがって、標的組織に対する親和性を単に高めるだけでは、標的組織に対する集積率は向上するものの、同時に標的組織の細胞による薬物の分解、代謝作用により薬物の不活性化も早くなり、その結果として投与された薬物の多くは目的の治療効果を発揮することができないこととなるので、薬物を大量に投与しないといけないということになる。

本発明者らは、このような知見に基づいて鋭意研究してきたところ、薬物の有効性を向上させるためには、標的組織に対する親和性のみならず、標的組織の細胞の周辺に効率よく滞留するための要因を加味することが重要であることを見出した。

## 【0012】

一般に、特定のレセプターに対する結合親和性を有するリガンドは、当該レセプターに特異的に結合する。このことにより、リガンドを標的組織に特異的に集積させることが可能となるのであるが、標的組織の細胞のレセプターに特異的に結合したリガンドの大半は、その親和性故にレセプター介在型エンドサイトーシスあるいは非特異的なフリユイドフェイズ (fluid phase) エンドサ

イトーシス等により当該細胞に取り込まれることになり、その結果、標的組織の細胞の周辺に滞留する薬物の量は急速に減少することになる。しかし、レセプターに結合したリガンドが全て細胞内に取り込まれて内在化されるのではなく、一部のリガンドはレセプターと解離して標的組織の細胞の周辺に再度滞留することになる。このように、標的組織の細胞表面のレセプターに結合したリガンドは、細胞に取り込まれて内在化されるか、レセプターと解離して再度細胞周辺に滞留することになるのであるが、これは細胞の特定のレセプターに対する親和性とは異なる要因に起因するものである。

## 【0013】

本発明においては、レセプターに結合したリガンドが細胞に取り込まれる割合と、レセプターと解離して再度細胞周辺に滞留する割合の関係を「内在化回避能」という。この内在化回避能が大きなりガンドは、標的組織の細胞のレセプターと結合はするが、標的組織の細胞に取り込まれる割合が低く、このようなりガンドは長時間に亘って標的組織の細胞周辺を滞留することになり、標的組織における持続時間が長くなるということになる。当該レセプターに対する特異的な結合親和性を有するリガンドは、一般的には結合したリガンドの多くが細胞に取り込まれて内在化することになり、短時間で代謝されることになる。ところがリガンドによっては、レセプターに結合したリガンドが細胞内に取り込まれるよりも、解離し易いものがあり、このようなりガンドを生理活性蛋白質などの薬物に結合させることにより、標的組織に集積後、細胞外周辺に滞留しうると考えられた。ところで、解離しやすいリガンドとは、解離速度定数  $k_{off}$  が大きいものを選択するということを意味する。

## 【0014】

一般に、リガンドのレセプターへの結合親和性の強さは

$$1/K_d = k_{on}/k_{off}$$

(ただし、 $k_{on}$  は結合速度定数、 $k_{off}$  は解離速度定数である。)

で表されるため、 $k_{off}$  が大きくなると結合親和性は低くなり、標的組織への集積効率は低下する。本発明者らはこの「内在化回避能」と結合親和性の強さという相反する2つの条件をうまくバランスさせることにより、標的組織において

持続時間の長いターゲティング型DDS製剤が得られること、及び、そのようなリガンドのスクリーニング方法を見出し、本発明するに至った。

## 【0015】

したがって、本発明は、標的組織に対するターゲティング型DDS製剤をスクリーニングする方法において、標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又は当該リガンドで修飾された物質を、当該レセプターへの結合を介した内在化回避能と結合親和性の強さとを指標としてスクリーニングする方法に関するものであり、より詳細には特定のレセプターへの結合を介した内在化回避能が、当該レセプターに対する解離速度定数 ( $k_{off}$ ) と内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) との比 ( $k_{off}/k_{int}$ ) であり、その比 ( $k_{off}/k_{int}$ ) が1以上であり結合親和性に関与する解離定数 ( $K_d$ ) が10mM以下であるリガンド又は当該リガンドで修飾された物質をスクリーニング方法に関する。

## 【0016】

より詳細には、本発明のスクリーニング方法は、細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質（以下、レセプター等という。）に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を当該レセプターを発現する遊離細胞または培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質を洗浄した後、当該レセプター等に対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化リガンドの結合量が、当該親和性リガンドそのものの非標識体を初期に添加した場合の結合量に比べて高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする方法、又は、細胞膜上に存在する特定のレセプター等に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプター等を発現する遊離細胞又は培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質をキレート剤入りのバッファー又は酸性バッファーで洗浄した後、当該レセプター等に対する標識化された親和性リガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化されたりガンド

の結合量が、レセプター等と結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が1以上であるリガンドを添加した場合の結合量に比べ高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングする方法に関する。

【0017】

さらに本発明は、前記した本発明のスクリーニング方法を行うことができる装置、それを行うための試薬キット、その方法でスクリーニングされたターゲティング型DDS製剤に適したリガンド、並びに、その方法でスクリーニングされたターゲティング型DDS製剤に適したリガンドを有する生理活性物質及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物に関する。

【0018】

以下において、本発明をより詳細に説明するが、まず最初に本明細書において使用する用語について説明しておく。

解離速度定数 ( $k_{off}$ ) : リガンドのレセプターからの解離速度をそのときの表面結合量で除することにより示される値である。より具体的には、本発明のスクリーニング方法においてこの値を算出する場合の計算式を例示をすれば、次の数式として表すことができる。

【0019】

$$k_{off} = X_{off} / \int_0^t X_s dt$$

(式中、 $X_{off}$  は解離したリガンドの累積量を、 $X_s$  はその時までの表面結合量をそれぞれ示す。)

即ち、 $k_{off}$  は、解離したリガンドの累積量 ( $X_{off}$ ) をその時までの表面結合量 ( $X_s$ ) の積分値で除して求めることができる。

【0020】

内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) : レセプターに結合したリガンドの内在化速度をそのときの表面結合量で除することにより示される値である。より具体的には、本発明のスクリーニング方法においてこの値を算出する場合の計算式を例示をすれば、次の数式として表すことができる。

【0021】

$$k_{int} = X_{int} / \int_0^t X_s dt$$



(式中、 $X_{int}$  は内在化したリガンドの累積量を、 $X_s$  はその時までの表面結合量をそれぞれ示す。)

即ち、 $k_{int}$  は、内在化したリガンドの累積量 ( $X_{int}$ ) をその時までの表面結合量 ( $X_s$ ) の積分値で除して求めることができる。

【0022】

結合解離定数 ( $K_d$ ) : 解離速度定数 ( $k_{off}$ ) を、レセプターの結合速度定数 ( $k_{on}$ ) で除した値として定義され、レセプターとリガンドとの親和性の尺度とされる。これを数式で示すと次式となる。

$$K_d = k_{off} / k_{on}$$

【0023】

本発明者らは、肝臓などへ集積・滞留しうるリガンドの条件を探るため、すでに各種のリガンドの合成法について報告している (特願平 8-89278 号)。

これらのリガンドの中で、まず、肝実質細胞上のアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) に対する 2 種類のリガンドである 3 分枝型ガラクトースリガンド ( $(Gal)_3$ ) と 3 分枝型 N-アセチルガラクトサミンリガンド ( $(GalNAc)_3$ ) 及びその IL-2 への結合体について検討を行った。最初に、ASGP-R に対する結合親和性の指標となる  $K_d$  値を算出した。その結果を次の表 1 に示す。

【0024】

【表 1】

各リガンドの  $^{125}I$ -ASOR のマウス肝細胞への結合に対する各リガンドの結合阻害定数 ( $K_i$ )

	ASOR	(GalNAc) <sub>3</sub>	(Gal) <sub>3</sub>
1	0.0074	2.95	681
2	0.0044	0.65	351
3	0.0100	1.37	292
Ave. ( $\mu$ M)	0.0072	1.65	354
s. d.	0.0028	0.96	266

【0025】

なお、結合阻害定数 ( $K_i$ ) は結合解離定数 ( $K_d$ ) と考えられるため、表 1

の  $K_i$  値の結果から各リガンドの  $K_d$  値が算出された。この結果、 $(GalNa c)_3$  の  $K_d$  値は  $1.65 \mu M$  と親和性が比較的高かったのに対し、 $(Gal)_3$  のそれは  $354 \mu M$  と親和性が  $(GalNa c)_3$  の  $1/200$  程度の低親和性リガンドであることがわかった。このように親和性の異なるリガンドと IL-2 との複合体 ( $(Gal)_3$ -IL-2、 $(GalNa c)_3$ -IL-2) のマウス肝ガンモデルでの腫瘍縮小効果を IL-2 を含め 3 者で比較した。その結果を次の表 2 に示す。

【0026】

【表 2】

(Gal)<sub>3</sub>-IL-2、(GalNa c)<sub>3</sub>-IL-2 及び IL-2 のマウス肝ガンモデルにおける抗腫瘍効果

	生理的食塩水	IL-2	IL-2	(Gal) <sub>3</sub> -IL-2	(Gal) <sub>3</sub> -IL-2	(GalNa c) <sub>3</sub> -IL-2	(GalNa c) <sub>3</sub> -IL-2
		(low dose)	(high dose)	(low dose)	(high dose)	(low dose)	(high dose)
腫瘍の大きさ(mm)	6.83	1.60	1.55*	0.65*	0.53*	3.72	3.86
(S.D.)	(5.32)	(0.39)	(1.18)	(1.01)	(0.91)	(5.61)	(4.54)
治癒数	0/5	0/7	0/6	4/7**	5/7**	0/7	0/6
死亡数	2/7	0/7 ***	1/7	0/7 ***	0/7	0/7 ***	1/7

表 2 中の \* は  $p < 0.05$  (Dunnett's-t-test) であることを示し、

\*\* は  $p < 0.01$  (Fisher's protected LSD) であることを示し、

\*\*\* は  $p < 0.05$  (Fisher's protected LSD) であることを示す。

【0027】

抗腫瘍効果の強さは  $(Gal)_3$ -IL-2 > IL-2 >  $(GalNa c)_3$ -IL-2 の順であることがわかった。IL-2 のターゲットは、肝細胞外液中に存在する IL-2 レセプターを表面に発現した抗腫瘍エフェクター細胞であることから、 $(Gal)_3$  リガンドにより IL-2 が効率的にエフェクター細胞を活性化できたことが示される。一方、高親和性リガンドである  $(GalNa c)_3$  を結合させると、肝臓への集積性は向上するものの、肝局所でエフェクター細胞を効率的に活性化できないことが示された。そこで、 $(Gal)_3$  リガンドによる有用性の理由を明らかにするため、さらに肝細胞への取り込みに関する速度

論的な解析を行った。

# 【0028】

まず、細胞におけるレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対するリガンドの取り込みに関する速度論モデルについて説明する。

図1は、細胞表面におけるレセプターとリガンドの作用を速度論的に示したものである。図1の下側が細胞内部であり、上側が細胞外部である。その中間に細胞表面が存在している。レセプター ( $R_s$ ) は通常細胞膜を貫通して細胞外に出しており、そこで細胞外に存在するリガンド ( $L$ ) と会合する。

図1のレセプター ( $R_s$ ) が、細胞外のリガンド ( $L$ ) と一次の速度定数 ( $k_{on}$ ) で結合し、リガンド-レセプター複合体 ( $LR_s$ ) を形成する。形成されたリガンド-レセプター複合体 ( $LR_s$ ) は、内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) で示される速度で細胞内に取り込まれるか、あるいは、解離速度定数 ( $k_{off}$ ) で示される速度でリガンドとレセプターが解離する。

細胞内に取り込まれたリガンド-レセプター複合体 ( $LR_i$ ) は、分解速度定数 ( $k_{deg}$ ) でリガンドが分解され、分解生成物 ( $X_{deg}$ ) として細胞外に放出する。図1中の  $V_r$  は、細胞表面にレセプターが出現するときの0次の速度定数であり、 $k_t$  はリガンドと結合していないレセプターが細胞内に収納される時の速度定数を示している。

# 【0029】

パルス追跡法 (Pulse chase法) によりこれらのリガンドの取り込み実験を行った。

$^{125}I$  で標識化されたリガンド  $^{125}I-(Gal)_3-IL-2$ 、及び  $^{125}I-(GalNac)_3-IL-2$  のマウス初代培養肝細胞への取り込み推移の結果を図2及び図3にそれぞれ示す。図2及び図3の、黒丸印 (●) はレセプター表面への結合画分量を示し、白四角印 (□) は細胞内へ内在化された画分量を示し、白三角印 (△) は細胞外に解離した画分量を示し、バツ印 (×) は分解生成物の画分量をそれぞれ示している。これらの値は、いずれも添加濃度で除することで分布容積 ( $\mu l/mg$  細胞蛋白質) の形で示した。

# 【0030】

この実験系においてASGP-Rを介した特異的画分量が全体の90%以上を反映していたため、各画分量についてはすべて特異的な画分の推移を観察した。その結果、両者の取り込み推移には違いが見られた。即ち、細胞表面のASGP-Rへ結合した $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ は、37℃でのインキュベーションにより主に培地中に解離し、細胞内へ取り込まれる画分の割合はそれに比べ低かった。これに対し $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ においては取り込みが主であり、解離画分の割合はそれに比べ低い傾向にあることがわかった。

さらに、取り込みおよび解離についてインテグレーションプロット(X軸; t分までの表面結合量の時間曲線下面積(AUC)、Y軸; t分後の取り込み又は解離量)を行い、その傾きから取り込み及び解離速度定数( $k_{\text{int}}$ 、 $k_{\text{off}}$  ( $\text{min}^{-1}$ ))を算出した結果を次の表3に示す。

【0031】

【表3】

$^{125}\text{I}$ -(Gal)<sub>3</sub>-IL-2と(GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2の肝細胞への取り込みに関する速度定数

	$k_{\text{int}}(\text{min}^{-1})[\text{S.D.}]$	$k_{\text{off}}(\text{min}^{-1})[\text{S.D.}]$	$k_{\text{off}}/k_{\text{int}}$
(Gal) <sub>3</sub> -IL-2	0.0344[0.0110]	0.0804[0.0110]	2.34
(GalNAc) <sub>3</sub> -IL-2	0.0186[0.00515]	0.0118[0.00257]	0.601

【0032】

表3の数値は3回の実験の平均値を示し、[]内の数値は標準偏差(S.D.)を示している。

この結果、 $k_{\text{int}}$ には大きな違いが見られなかったが( $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ ;  $0.034\text{min}^{-1}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ ;  $0.0184\text{min}^{-1}$ )、 $k_{\text{off}}$ 値は $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ の方が $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ に比べ約8倍高く( $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ ;  $0.0804\text{min}^{-1}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ ;  $0.0118\text{min}^{-1}$ )なっていることがわかる。

このときの $k_{\text{off}}$ と $k_{\text{int}}$ の比( $k_{\text{off}}/k_{\text{int}}$ )、即ち内在化回避能をみると、 $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ では2.34であるのに対して、(G

$\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ では0.601であり、両者に大きな差があることがわかった。

### 【0033】

次に連続インキュベーション法 (Continuous Incubation法) による取り込み実験により検討した。

$^{125}\text{I}$ で標識化されたりガンド  $^{125}\text{I}-(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ 、及び  $^{125}\text{I}-(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  及び  $^{125}\text{I-IL-2}$  のマウス初代培養肝細胞への取り込みの推移の結果を図4、図5及び図6にそれぞれ示す。図4～6の、黒丸印 (●) は細胞表面に結合した画分量を示し、黒四角印 (■) は細胞に取り込まれて内在化した画分量を示し、白三角印 (△) は分解生成物の画分量をそれぞれ示している。これらの値は、いずれも添加濃度で除することで分布容積 ( $\mu\text{l}/\text{mg}$ 細胞蛋白質) の形で示した。

この実験系でも培養媒体中に遊離の  $\text{GalNAc}$  を存在させ  $\text{ASGP-R}$  を介する特異的な画分とそれ以外の非特異的な画分を分離評価した。  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  及び  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  については、前記したパルス追跡法と同様に80%以上を占める特異的な画分量を示した。  $\text{IL-2}$  においては大部分が遊離  $\text{GalNAc}$  で追い出されない非特異的な結合、取り込み、及び分解が見られていることから、全部の画分量を示した。

### 【0034】

その結果、  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ 、  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  の取り込みの推移は、共にインキュベート直後に肝細胞表面への結合と細胞内への取り込みが観察され、定常状態に達した後に培地中での分解物量が上昇した。これは典型的なレセプターを介したエンドサイトーシスによるものである。ただし、その取り込み容積の絶対値は  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  の方が  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  に比べ4～5倍程度高く、  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  の方が肝臓での消失クリアランスが高い傾向にあることが示された。これらの結果をもとに両者の各画分推移についてナップ (Napp) を用いたフィッティング (Fitting) を行ない (Hisaka A, et al., J. Pharmacokinet. Biopharm., 26(5), 495-519(1998))、取り込みに関する速度定数を算出した。なお、フィッティングに

おいてはパルス追跡法により得られた  $k_{off}/k_{int}$  の比を固定して行なった。即ち、 $(Gal)_3-IL-2$  の場合には、 $k_{int}=k_{off} \times 0.428$  とし、 $(GalNAc)_3-IL-2$  の場合には、 $k_{int}=k_{off} \times 1.576$  とした。

【0035】

【表4】

$^{125}I-(Gal)_3-IL-2$  と  $^{125}I-(GalNAc)_3-IL-2$  の肝細胞への取り込みに関する速度定数

	$k_{int}(min^{-1})$	$k_{off}(min^{-1})[S.D.]$	$k_{on}(min^{-1})[S.D.]$	$k_{Pt}(\mu l/min/mg \text{ cell protein})$
$(Gal)_3-IL-2$	0.0896	0.2094(0.0806)	0.0183[0.0023]	0.9864[0.0520]
$(GalNAc)_3-IL-2$	0.0451	0.0286(0.0053)	0.0232[0.0029]	2.4329[0.1074]

【0036】

この結果、パルス法により得られた値にほぼ等しい  $k_{int}$  及び  $k_{off}$  値に加え、それぞれの分解速度定数 ( $k_{deg} (min^{-1})$ ) 及び結合クリアランス ( $k_{on} R_t (\mu l/min/mg \text{ cell protein})$ ) が得られた。 $k_{deg}$  については  $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$  で大きな違いが見られなかったが、 $k_{on} R_t$  については  $(GalNAc)_3-IL-2$  の方が約 2.5 倍高い値を示した。

一方、 $IL-2$  に関しても、取り込み機構については不明であるが  $ASGPR$  を介さない非特異的な取り込みによる分解が観察された。その分解速度定数の指標となる推移の傾きは  $(Gal)_3-IL-2$  のその約  $1/3.33$  と、未修飾  $IL-2$  の場合にも、生体内において肝臓における消失が無視できないものであると判断した。この傾きの比 ( $f=3.33$ ) から後述する実施例で示した方法により  $IL-2$  の肝クリアランス ( $CL_h$ ) が、 $2.94 ml/min/kg$  であると見積もられた。

【0037】

次に、リガンドの生体内における動態モデルについて説明する。以上の実験で使用してきた、 $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$  及び  $IL-2$  の生体内における薬効の違いを説明する為、生理学的な知見に基づいた薬物動態モデルを構築した。これを図 7 に示す。

使用したパラメーターはインビボ及びインビトロの実験で得られた薬物動態及び速度論パラメータ並びに生理学的パラメータであり、これを以下に示す。

【0038】

- $k_{on}$  Rt ; レセプターに対するリガンドの会合クリアランス<sup>a)</sup>  
 $k_{off}$  ; リガンドーレセプター複合体の解離速度定数<sup>a)</sup>  
 $k_{int}$  ; リガンドーレセプター複合体の内在化速度定数<sup>a)</sup>  
 $k_{deg}$  ; 内在化されたりガンドーレセプター複合体の分解速度定数<sup>a)</sup>  
 $F$  ; インビトロからインビボへの相関係数<sup>b)</sup>  
 $V_b$  ; 血漿中の分布容積<sup>c)</sup>  
 $V_e$  ; 肝臓の細胞外液の容積 ( $0.2 \times 1.3 \times 1000 / 22 = 11.8 \text{ ml/kg}$ )  
 $Q_H$  ; 肝臓における血漿流量<sup>c)</sup>  
 $CL_{other}$  ; 肝臓以外でのクリアランス<sup>d)</sup>  
 $CL_h$  ; 肝臓での非特異的クリアランス<sup>e)</sup>  
 $Dose$  ; リガンドの投与量 ( $5 \times 10^4 \text{ ng/kg}$ )  
 $Kd_{IL2}$  ; IL-2 レセプターに対する解離定数 ( $0.155 \text{ ng/ml}$ )

注：(a) は実験値 (表 3 参照)

(b) はインビトロとインビボの実験から得られた推定値で、36.9 とした。

(c) はインビボでの実験から得られた値である。

(d) は実際のクリアランスから得られる実験値を用いた。

(e) はインビトロの IL-2 の取り込み実験から得られた値である。

【0039】

リガンド修飾 IL-2 はともに主要な分布並びに消失臓器が肝臓であるため、肝細胞外液と血液循環系からなる単純なコンパートメントの生理学的な薬物動態モデルとした。これをもとにステラ (Stella) (Bogen et al., Science, 246: 138-142 (1989)) を用いてシュミレーションを行い、体内動態の予測計算を行なった。IL-2 については実験的に観察された肝臓における非特異的な

消失クリアランスをモデルに加え、ASGP-Rへの結合クリアランスを0とした。なお、各画分中のリガンド-IL-2ハイブリッド体濃度に関する速度式を下記に示す。

【0040】

(血漿中画分)

$$dCb/dt = (-Q_H * Cb + Q_h * Ce) / V_b$$

(肝細胞外液中画分)

$$dCe/dt = (Q_H * Cb - k_{on} RT * Ce * F + k_{off} * X_s - Q_H * Ce) / V_e$$

(肝細胞表面結合画分)

$$dX_s/dt = k_{on} P_t * Ce * F - (k_{off} + k_{int}) * X_s$$

(肝細胞内画分)

$$dX_i/dt = k_{int} * X_s - k_{deg} * X_i$$

(分解画分)

$$dX_{deg}/dt = k_{deg} * X_i$$

(レセプター占有率)

$$Receptor\ Occupancy = Ce / (K_d + Ce)$$

【0041】

この場合リガンド-IL-2あるいはIL-2の細胞外液中からの運命としては、①ASGP-R表面への結合→②肝細胞内への取り込みもしくは細胞外液中への解離→③エンドサイトーシス機構による分解の経路(A)と、①'細胞外液中での抗腫瘍エフェクター細胞表面への結合(→②'エフェクター細胞の活性化)の経路(B)の2つを想定している。(B)の経路へ移行するIL-2の量や滞留時間を増加させる方向へ進めさせることにより、肝臓局所でのIL-2の抗腫瘍効果が高まると考えられる。逆に(A)の経路へ移行するIL-2量の割合が高すぎると、分解を受け過ぎることにより血中滞留性の低下が起こるため、IL-2が肝臓局所において十分な薬理作用を発揮できない。

【0042】

前記で説明したパラメーターのうち、(a)については(Gal)<sub>3</sub>-IL-



2の取り込み実験データから得られた値を、(b)の肝臓以外の臓器による取り込みクリアランスについては体内動態実験で得られた $(Gal)_3-IL-2$ の腎取り込みクリアランスの値を用いた。(c)の $IL-2$ についてのみの肝クリアランス $(CL_{NSP})$ は、連続インキュベーション法により得られた $IL-2$ の非特異的な取り込みによる分解速度と $(Gal)_3-IL-2$ の分解速度との比がそれぞれの肝固有クリアランスの比に等しいとおいて計算した。ここで、 $(Gal)_3-IL-2$ の固有クリアランス $(CL_{int\ h})$ は、

$$CL_{int\ h} (Gal) = F * k_{on} R t (Gal) * k_{int} (Gal) / (k_{off} (Gal) + k_{int} (Gal))$$

にて表される。ここに、Fは前記した換算定数であり、その算出法は後述する。

また、使用したパラメーターのうち肝細胞外容積(Ve)は、その容積が臓器重量の約20%であるという宮内らの報告(S.Miyauchi, et al., J.Pharmacokin. Biopharm. 15: 25-38 (1987))より算出した。

#### 【0043】

$Q_H$  (肝血漿流速) 及びF (インビトロで得られた $k_{on} R t$  (結合クリアランス) のインビボモデルへの換算定数) は以下のようにして求めた。即ち、 $^{125}I$  標識体の静注後の体内動態検討により得られた $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$ のそれぞれの肝取り込みクリアランス $CL_{uptake\ Li}$ は、投与初期での肝臓への分布を測定している為、インビトロ実験で算出した結合クリアランス( $k_{on} R t$ )を主に反映していると考えられる。肝取り込みに関する固有クリアランス( $CL_{int, uptake}$ )は、

$$CL_{int, uptake} = k_{on} R t \times F$$

(ここで、Fはインビトロからインビボへの換算定数) となるべきである。従って、ウェルステアードモデル(Well-stirred model)に従えば下記のようなになる。

#### 【0044】

$$CL_{uptake\ Li} = Q_H * CL_{int, uptake} / (Q_H + CL_{int, uptake})$$

ただし、 $CL_{int, uptake} = F \times (k_{on} R t, vitro)$  である。

これについて  $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$  のそれぞれの連立方程式を解くことにより  $Q_H$  及び  $F$  の値を算出した。

また、 $IL-2$  依存性の  $CTLL-2$  細胞を用いたインビトロ生物活性測定において修飾による生物活性の低下が見られなかったことから、リガンド- $IL-2$  及び  $IL-2$  の  $IL-2$  レセプターに対する解離定数は全て同じ値 ( $K_d = 10 pM$ ; 高親和性) に設定した。

#### 【0045】

これらの結果から、2種リガンド修飾  $IL-2$  及び未修飾  $IL-2$  の生体内での動態の違いの原因をそれぞれの薬物動態の比較により解明する為、インビボならびにインビトロの実験から実測された値をもとに生理学的モデルによる予測計算を行った。リガンド- $IL-2$  ハイブリッド体の血漿中濃度 (図8)、肝細胞外液中濃度 ( $C_{ext}$ ) (図9) 及びハイブリッド体による  $IL-2R$  の占有率 ( $RO$ ) (図10) の時間推移のシュミレーションの結果を図8、図9及び図10にそれぞれ示す。図8、図9及び図10の、太い実線は  $(Gal)_3-IL-2$  を示し、細い実線は  $(GalNAc)_3-IL-2$  を示し、破線は未修飾  $IL-2$  をそれぞれ示している。

#### 【0046】

薬効が最も低い傾向にあった  $(GalNAc)_3-IL-2$  は、投与後初期から約10分までの血漿中及び肝細胞外液中からの消失が他のものに比べ非常に速いことがわかった。従って本リガンドは投与後速やかに  $ASGP-R$  を介した消失により血中濃度が大きく低下してしまうことが確認された。ただし、10分後からの滞留性は最も高かった。これはおそらく  $ASGP-R$  に強く結合した画分が徐々に循環血中へ放出される為ではないかと推測される。薬理作用の指標と考えられる  $IL-2$  レセプターの占有率 (図10) は投与後約55分まで最も低かったが、投与10分からの低下は比較的緩やかであった。

#### 【0047】

薬効が2番目に高い傾向にあった  $IL-2$  は投与直後の血漿中濃度及び肝細胞外液中濃度 ( $C_{ext}$ ) は最も高かったが、それ以降の血中並びに肝細胞外

液中における滞留性が観察されず、投与30分後に (Gal)<sub>3</sub>-IL-2と、約50分後に (GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2と濃度が逆転した。ROについても同様な傾向を示し、投与後約30分までは他に比べ最も高かったものの、その低下が最も速かった。従って、IL-2については投与後ある程度時間が経った以降の滞留性に問題があることが示唆された。

# 【0048】

これに対し薬効がもっとも高い傾向にあった (Gal)<sub>3</sub>-IL-2は、(GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2及びIL-2が示した時間推移の特徴をそれぞれ併せ持つ中間的な推移を示した。即ち、投与直後の血漿中濃度、及びC<sub>e</sub> extともに両者の中間程度の値であり、10分後からの滞留性もほぼ両者の間程度であった。このような特徴を有することからROについては投与後30分まではIL-2よりわずかに低い値を示すものの大きな違いは見られず、その後80分までもっとも高い値で推移した。

# 【0049】

さらに、前記した予測計算により算出されたそれぞれの薬物動態パラメーターとなる平均滞留時間 (MRT (分))、全身クリアランス (CL<sub>total</sub> (ml/分/kg))、分布性 (V<sub>dss</sub> (ml/kg))、IL-2レセプターの75%占有時間 (分) 及び肝細胞外液中濃度の時間曲線下面積 (AUC) (AUC<sub>0-∞</sub> (C<sub>e</sub> ext) (ng\*分/ml)) を比較した結果を次の表5に示す。

# 【0050】

【表5】

(Gal)<sub>3</sub>-IL-2、(GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2及びIL-2の予測計算により算出された薬物動態パラメーター

パラメーター		(Gal) <sub>3</sub> -IL-2	(GalNAc) <sub>3</sub> -IL-2	IL-2
MRT	(min)	11.1	9.72	8.33
CL <sub>total</sub>	(ml/min/kg)	10.6	22.2	5.62
V <sub>dss</sub>	(ml/kg)	117	216	46.8
IL-2Rの75%占有時間	(min)	56	37	48
AUC <sub>0-∞</sub> (C <sub>e</sub> extra)	(ng*min/ml)	38012	7557	67277

# 【0051】

まず全身におけるパラメーターを比較してみると、血中からのリガンド消失能力の指標となる全身クリアランス ( $CL_{total}$ ) は、 $(GalNa c)_3-IL-2$  が最も高く、 $(Gal)_3-IL-2$  はその  $1/2$  程度、最も低い値を示す  $IL-2$  はその  $1/4$  程度であった。薬物が分布する容積の指標となる分布容積 ( $V_{dss}$ ) についても同様に肝臓移行性の高さを反映し、 $(GalNa c)_3-IL-2 > (Gal)_3-IL-2 > IL-2$  の順となった。薬物速度論に基づけばリガンドの血中並びに肝細胞外液中濃度の減少の速さは、これらの消失能力 ( $CL_{total}$ ) と分布性 ( $V_{dss}$ ) のバランス (比) によって決定される。このバランスを表すパラメーターの1つである平均滞留時間 (MRT) を計算すると、 $(Gal)_3-IL-2$  が最も高い値を示した。これは  $(Gal)_3-IL-2$  が  $ASGP-R$  への適度な親和性並びに内在化速度を示す為、血中消失がある程度抑えられつつ、かつ  $ASGP-R$  に結合し、そこに滞留することによる肝細胞外液滞留効果を示している結果であると考えられる。以上の結果から、薬効の最も高かった  $(Gal)_3-IL-2$  は全身からの消失、及び滞留性の両面で  $IL-2$ 、 $(GalNa c)_3-IL-2$  に対し、バランスの取れた性質を有することが示された。

## 【0052】

肝臓の  $IL-2$  レセプターに対するリガンドの暴露 (exposure) を表す指標の一つと考えられる肝細胞外液中濃度の  $AUC$  ( $AUC_{0 \sim \infty} (C_{e \ ext})$ ) を、両リガンド修飾体で比較してみると、 $(GalNa c)_3-IL-2$  は  $(Gal)_3-IL-2$  のその約  $1/4.4$  程度であり、両者の薬効の違いを反映したものであった。しかし、 $IL-2$  の  $AUC_{0 \sim \infty} (C_{e \ ext})$  が  $(Gal)_3-IL-2$  よりも高い結果は、薬効の面で  $(Gal)_3-IL-2$  よりも劣っていた結果とは一見矛盾していた。 $IL-2$  の  $AUC_{0 \sim \infty} (C_{e \ ext})$  が高いのは投与直後から10分後までの血中濃度が高いためである。 $IL-2$  並びに両リガンド修飾体の効果は、 $IL-2R$  への結合を介して発揮されることから、この指標は  $(Gal)_3-IL-2$  のもつ血中滞留性の高さが十分反映されていないと考えられる。

## 【0053】

そこで、IL-2Rの75%占有時間を計算したところ、薬効の強さを反映し、 $(Gal)_3-IL-2 > IL-2 > (GalNac)_3-IL-2$ の順となった。よって、IL-2の薬効は $AUC_{0 \sim \infty} (C_{ext})$ の大きさも重要な因子の一つではあるが、IL-2Rを適度に飽和されるだけの肝細胞外液中における有効な薬物濃度の滞留性もIL-2の薬効に非常に重要であることが示唆された。

## 【0054】

これまでの検討から今回用いた2つのリガンドのうち、 $(Gal)_3$ が「血中消失」、「肝細胞外液中での滞留性」の2つのバランスを最もほどよく有していることが明かとなった。次により薬効発現の面ですぐれたリガンドの設計を行うため、 $(Gal)_3-IL-2$ のパラメーターを基に本生理学的モデルにおいて種々の設定条件によるシミュレーションを行った結果の血漿中濃度の推移を図11に、肝細胞外液中濃度の推移を図12に、及びIL-2レセプターの占有率(R<sub>O</sub>)の時間推移を図13にそれぞれ示す。

## 【0055】

図11、図12及び図13の各図は、 $k_{int}$ を一定として $k_{off}$ の値を変化させたものである。即ち、各図の(A)は $k_{int}$ の値が $0.0896/min$ （これは $(Gal)_3-IL-2$ の場合の値である。）の場合、(B)は $k_{int}$ の値が $0.00896/min$ （これはAの $1/10$ 量）の場合、(C)は $k_{int}$ の値が $0.000896/min$ （これはAの $1/100$ 量）の場合を示している。そして、各図の $k_{off}$ の値は $(Gal)_3-IL-2$ の場合の値である $0.209$ （破線）を中心にして、その $10$ 倍（点線）、 $100$ 倍（細点線）および $1/10$ 倍（実線）、 $1/100$ 倍（細破線）と変化させた場合を示している。

## 【0056】

$k_{int} = 0.0896/min$ の場合（図11、図12及び図13の(A)）、 $k_{off}$ 値の増加に伴い血漿中及び肝細胞外液中のリガンド-IL-2ハイブリッド体濃度が高まり、その滞留性も向上することが示された。同様にIL-2レセプターへの占有率も $k_{off}$ 値が高い方が高く、しかもより長く滞留す

ることが示された（図13の（A））。このような効果は $k_{off}$ 値が高まることにより肝臓からのクリアランスが押さえられ（ASGP-Rに結合したリガンドの大部分が取り込みを受けずに細胞外液中へ解離するため）、循環血中ならびに肝細胞外液中へリザーブされるからと考えられる。よって、 $(Gal)_3-IL-2$ の方が $(GalNac)_3-IL-2$ に比べ肝癌モデルにおいて薬効が強かったのは、 $k_{off} > k_{int}$ である $(Gal)_3-IL-2$ の方が、 $k_{off} < k_{int}$ である $(GalNac)_3-IL-2$ に比べ肝細胞外液中濃度及び滞留性が高まり、IL-2Rの占有率が高まったためであると推測される。

## 【0057】

これらの結果、 $k_{off}$ が細胞内への内在化に打ち勝つべく、 $k_{int}$ に比べ高い値であることが重要であることがわかった。ただし、 $k_{off}$ の値を $(Gal)_3-IL-2$ の測定値の100倍としても肝細胞外液中濃度は徐々に消失している。これは設定した $k_{int}$ では（ $(Gal)_3-IL-2$ にもあてはまる）肝臓での取り込み（内在化）の影響が強すぎるため、それに打ち勝つだけの $k_{off}$ の値を設定すると、レセプター（ASGP-R）からの解離が極めて速くなるため血中消失の決定因子が腎臓などの他臓器による消失となるためと考えられる。

## 【0058】

そこで、 $k_{int}$ の値をさらに $1/10$ 、 $1/100$ と低下させてシミュレーションを行った結果、 $k_{off}$ の値を $k_{int}$ に比べある程度高めることによりその肝細胞外液中濃度およびIL-2レセプターの占有率の滞留性が高まること示された（図12及び図13の（B）並びに図12及び図13の（C））。図12の（B）と（C）の結果を比較すると、このような滞留効果は内在化速度が低いほど強い傾向にあった。ただし、両者においていずれも $k_{off}$ の値には至適範囲があり、これがあまり速くなると逆に滞留性が低下した。これは解離があまりにも速いとレセプター（ASGP-R）との親和性が低くなり滞留部位としてのレセプター効果が発揮できないことを意味する。このようにASGP-Rからの解離は内在化に比べれば速やかである方が血中滞留性の維持にとっては好都合である反面、ある程度以上速くなるとASGP-Rのもつリガンドの滞留部位

としての機能を失うため、適切な IL-2 レセプター占有率の維持にとって  $k_{int}$  の絶対値並びに  $k_{int}$  と  $k_{off}$  とのバランスも重要であることがわかった。

【0059】

そして、以上の3検体についての速度論モデル解析結果をまとめると次のようになる。

(1)  $CL_{total}$  で表される血中消失の効率については IL-2 が最も有利で  $(GalNac)_3-IL-2$  が最も不利であり、 $(Gal)_3-IL-2$  は両者の中間の適度なものであった。その理由は  $(GalNac)_3-IL-2$  及び  $(Gal)_3-IL-2$  では、ASGP-R を介したエンドサイトーシスを受けるのに対し、IL-2 は受けないからである。 $(GalNac)_3-IL-2$  の消失効率が大きいのは、インビトロの実験で証明されたように肝クリアランス ( $CL_h$ ) が高くその効率が大きい為である。

【0060】

(2)  $V_{dss}$  で表される肝細胞外液中における滞留性効果は  $(GalNac)_3-IL-2$  が最も有利で、IL-2 が最も不利であり、 $(Gal)_3-IL-2$  は同様に両者の中間の適度なものであった。その理由は  $(GalNac)_3-IL-2$  及び  $(Gal)_3-IL-2$  では ASGP-R に結合することによってそこに長時間滞留することができるのに対し、IL-2 では滞留できないからである。

【0061】

(3) 実験的に求められた薬効が  $(Gal)_3-IL-2 > IL-2 > (GalNac)_3-IL-2$  であったことを考えると、上の2つの要因のバランスが重要であることが示唆される。つまり、 $(Gal)_3-IL-2$  は程よい効率で血中から消えることである程度の血中濃度が維持されながら、レセプターにある程度の親和性をもってそこに滞留できたと考えられる。

【0062】

(4) そのような両要因のバランスを示す体内動態パラメーターを検索することは困難であるが、その一例として MRT を計算すると確かに薬効が一番大きく

観察された (Gal)<sub>3</sub>-IL-2 が最も高い。さらに IL-2R との親和性を考慮してレセプター占有率を計算すると75%を占有する時間がもっとも長いのは (Gal)<sub>3</sub>-IL-2 であり、最も短いのが (GalNac)<sub>3</sub>-IL-2 となり、本速度論モデルを用いた解析が2種リガンド修飾 IL-2 及び未修飾 IL-2 の薬効の違いをある程度説明できることが分かった。

## 【0063】

このように、「血中消失効率」、「肝細胞外液での滞留性」という2つの薬物動態学的パラメータのバランスが、本リガンド群の薬効発現において極めて重要であり、本生理学的モデルを用いることによってこれら2つの要因を考慮に入れた、動態/薬効の評価/予測が可能であることが示された。今回実験に使用した3検体の中では、これらのバランスがもっともとれている (Gal)<sub>3</sub>-IL-2 が、IL-2 の肝局所における抗腫瘍エフェクター細胞の活性化をもっとも効率よく行なうことができた。このものが最も強い薬効を示した理由は、以上の実験で示された速度論的考察によるものと考えられる。

## 【0064】

上記結果に基づき「血中消失効率」、「肝細胞外液での滞留性」という2つの薬物動態学的パラメータのバランスを両立させたターゲティング型DDS製剤を製造する上で必要なリガンドを考える場合には、標的組織の細胞が薬物を取り込んで代謝、分解させる機能を有するレセプターに対する内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) と解離速度定数 ( $k_{off}$ ) とのバランスをとることが重要であり、この比 ( $k_{off}/k_{int}$ ) で示される当該レセプターへの結合を介した内在化回避能とレセプターへの結合親和性の強さ ( $1/K_d = k_{on}/k_{off}$ ) とを指標としてスクリーニングすればよいことが示された。

## 【0065】

本発明の内在化回避能をさらに詳細に説明すると次のようになる。

- (1) 比 ( $k_{off}/k_{int}$ ) で示される内在化回避能が1より大きいことが好ましい。
- (2) 内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) はできるだけ小さいほうが好ましい。
- (3) 解離速度定数 ( $k_{off}$ ) は適度な大きさに抑えることが好ましい。



## 【0066】

解離速度定数 ( $k_{off}$ ) の方が、内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) より大きくすることにより ( $k_{off}/k_{int} > 1$ )、肝クリアランスが低くなり血中消失効率が低くなり、肝細胞外液中濃度及び IL-2R の占有率を高く保持できる。内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) が如何なる場合でも解離速度定数 ( $k_{off}$ ) が上昇すれば肝細胞外液中の薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) を増大させることができる。

また、内在化速度定数 ( $k_{int}$ ) をできるだけ小さくすることにより内在化による肝クリアランスを低くすることができ、肝細胞外液中におけるリガンド-蛋白質ハイブリッド体の滞留性を上げることができる。

さらに、解離速度定数 ( $k_{off}$ ) を大きくすることにより肝細胞外液中での滞留性は上昇するが、あまり大きくなり過ぎると逆に滞留性の効果は低下してしまう。これは ASGP-R によるリザーバーとしての機能がなくなるからである。解離速度定数 ( $k_{off}$ ) が大きくなるに連れて血中消失カーブを決める要因が ASGP-R からの解離による血中への供給から腎臓等他臓器による消失になるため、一種のフリップフロップが見られる。したがって、解離速度定数 ( $k_{off}$ ) はこのようなフリップフロップが起こる大きさ以下に抑えることが好ましい。

## 【0067】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、ターゲティング型 DDS 製剤を製造上で重要となるリガンドをスクリーニングする際の指標を提供するものである。したがって、本発明の方法は有効成分としての薬物やリガンド及び標的組織の細胞表面におけるレセプターや抗原等の蛋白質の具体的な状況に制限されるものではなく、リガンドを選択する際のスクリーニングの指標を提供するものである。以下では、より具体的に本発明の実施の態様を説明してゆくが、本発明はこれらの具体的な態様に限定されるものではない。

## 【0068】

本発明のリガンドとしては、ターゲティング型 DDS 製剤としての標的組織の

細胞に親和性があるものであればよく、リガンド自体が薬物としての作用を有するものであってもよいが、好ましくはリガンド自体に生理活性が無いものがよい。このようなリガンドとしては、薬物と結合し得る官能基を有しており、かつ生体内において副作用を示さないものであれば特に制限はない。このようなリガンドを本発明のスクリーニング方法によってスクリーニングすることができるし、また本発明の開示に従って速度論的に解析して、最適なものに設計することができる。

また、リガンドは細胞の特定のレセプターとある程度、好ましくは解離定数が 10 mM 以下であるようなある程度の親和性を有することが必要である。

#### 【0069】

本発明における標的組織の細胞表面における特定のレセプターや抗原等の蛋白質としては、リガンドに親和性を有するものであり、好ましくは薬物と親和性を有さないものがよい。また、ターゲティング型 DDS 製剤とするためには、当該レセプターは組織に特異的なものが好ましいが、本発明の開示に従えば必ずしも特異的である必要はなく、標的とする組織にリガンドが集積し得るレセプターであればよい。例えば、肝臓を標的組織とする場合には、肝実質細胞に多数存在するアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) などが好ましい。

#### 【0070】

より具体的の本発明の細胞表面のレセプターや抗原などの蛋白質の対象となりうるものの具体的な条件を例示するならば、下記の 3 点のいずれかを満たせば良いと考えられる。

1.  $R_t \times K_{int}/K_d > \text{他臓器での固有のクリアランス}$

であるようなレセプター密度 ( $R_t$ ) を有するもの。ここで  $R_t$  は、細胞表面蛋白質の  $B_{max}$  で代用することができる。

ここに、 $B_{max}$  は結合容量を意味し、結合実験におけるシャッチャードプロット (Schatchard plot) 解析によって算出された結合最大量を細胞数ないしは細胞蛋白質量で規格化することによって得られる値である。実験的には、

$$B_{max} = C_b * (C_f + K_d) / C_f$$

(ただし、 $C_b$  は結合型濃度、 $C_f$  は非結合型濃度、 $K_d$  は結合解離定数)

によって測定した値から算出することも可能である。

2. 細胞表面レセプターあるいは蛋白質が標的臓器のみに発現しているもの。

例えば、アシアロ糖蛋白質レセプターのようにほぼ完璧なレセプターが挙げられる。

3. 細胞表面のレセプターあるいは蛋白質が他臓器に比べ標的臓器に高く発現しているもの。例えば、標的臓器での発現率と他臓器での発現率との比が、1を越えるものが好ましい。

#### 【0071】

このような条件を満たすレセプターとしては例えば、実施例における肝実質細胞上のアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGP-R) 以外に、肝臓の非実質細胞上にかなり選択的に発現しているマンノースレセプターが考えられる。また、上皮細胞成長因子 (EGF) レセプター、インスリンレセプター、トランスフェリンレセプター、フォーレート (f o l a t e) レセプターなどについては発現に細胞特異性が低いものの  $R_t$  が高いので、その発現特異性が高い臓器については対象となりうる。

また、特定の癌細胞での発現が正常細胞に比べ高まるものについても、標的となる。一方、レセプター以外の細胞膜上に発現する蛋白質としては例えば、各種トランスポーターや抗原等がその標的となりうる。ただし、標的となる細胞膜上の蛋白質に対するリガンドのデザイン及びスクリーニングは、レセプターに対するものの方がそれ以外の発現蛋白質に比べ容易であるためより好ましい。

#### 【0072】

本発明の薬物としては、生理活性を有するものであればよく、それ自体に生理活性があるものであってもよいが、それ自体には生理活性が無い場合であってもリポソームやリピッドマイクロスフェアなどのように生理活性物質のキャリアーとなるものであってもよい。また、薬物自体が前記したリガンドの機能を有するものであってもよい。

本発明の薬物としては、リガンドとの結合による活性への影響が少なく、体内動態を大きく変化させる事が可能な生理活性蛋白質が好ましい。また、標的組織の病変した細胞に特異的に取り込まれて活性を示すか、又は免疫系細胞に作用す

る薬物も本発明の好ましい薬物のひとつである。さらに、本発明の薬物としては、生体内において局所で必要な時に必要量発現され、種々の機能を担っているものであって、全身投与した場合に標的部位以外への分布による種々の副作用を生じ、速やかに消失するためインビボで効果を得るのに瀕回あるいは大量投与を必要とする薬物が好ましい。

本発明で使用される薬物は、本発明のリガンドと組み合わせることにより、薬物の標的細胞又は臓器中への集積効率を高め、しかも持続的な効果を発揮させることが可能なDDS製剤を構築することができる。

#### 【0073】

このような薬物としては、具体的には、例えば、インターロイキン類、インターフェロン $\alpha/\beta/\gamma$ 、腫瘍壊死因子(TNF)等のサイトカイン類、肝細胞成長因子(HGF)や上皮細胞成長因子(EGF)等の細胞増殖調節因子、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)やカタラーゼ、チオレドキシンなどの酸化酵素などの生理活性蛋白質が挙げられる。このような生理活性蛋白質はその由来を問わず、動物由来のものであっても、植物由来のものであっても、微生物由来のものであってもよい。また、大腸菌、酵母、チャイニーズハムスターオvari細胞などにこれらの蛋白質の遺伝子又はその変異体を組み込んで発現させて生産された蛋白質であってよい。さらに他の蛋白質とのキメラ体であってもかまわない。また、本発明の生理活性蛋白質は、共存蛋白質による影響を最小限に抑える為、使用前に可能な限り精製しておくことが望ましい。

#### 【0074】

また、生理活性蛋白質以外にもアドリマイシン、マイトマイシンC、メトトレキセート等の抗がん剤やアジドチミジン(AZT)、アデニンアラビノシド(araA)等の抗ウイルス剤のように毒性が強く標的部位以外への分布による副作用が問題となる低分子薬物についても対象となりうる。さらに、このような毒性の高い低分子薬物等の運搬体として注目されているアルブミンやグロブリンなどの天然蛋白質、各種モノクローナル抗体あるいはその一部、デキストラン、キチン、キトサン、イヌリンなどの多糖類、ポリリジン、ポリグルタミン酸などのポリアミノ酸、ジビニルエーテル無水マレイン酸共重合体(DIVEMA)、ス

チレン無水マレイン酸共重合体 (SMA)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニルアルコールなどの合成高分子、さらにはリポソームやリピッドマイクロソフェア等の脂質集合体キャリアーなどについても、その表面へのリガンド導入によりキャリアー自身の体内動態制御が可能となることからその対象となりうる。

## 【0075】

本発明のリガンドと薬物とは、通常の方法により結合させることができる。結合は共有結合が好ましいが、これに制限されるものではない。リガンドと薬物の結合は化学的方法で行うこともできるが、トランスグルタミナーゼなどの酵素を用いた方法により行うこともできる。

薬物へのリガンド導入法としてはつぎのようなものが挙げられる。まず薬物が蛋白質の場合にはリガンド導入した複合体の構造が均一で、その生物活性が低下しない事が医薬品開発を行なう上で望ましいため、本発明者らが開発したアルキルアミン導入型リガンドのトランスグルタミナーゼを利用した特定の Gln 残基のみへの位置選択的修飾法 (特願平 6-270102 号) が望ましいが、これに限定されるものではない。

## 【0076】

さらに、他の導入法としては、SPDP (N-Succinimidyl3-(2-pyridyldithio)propionate)、SMPT (Succinimidylloxycarbonyl- $\alpha$ -methyl- $\alpha$ -(2-pyridyldithio)toluene)、SMCC (Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) 等を導入したリガンドによる蛋白質中の Cys 残基のみの選択的修飾法も考えられる (Goodson and Katre, 1990, Biotechnology 8, 343-346, Benhar et al., J. Biol. Chem. 269, 13398-13404)。さらには、蛋白質の N 末端アミノ酸が Ser あるいは Thr である天然あるいは遺伝子組換え型蛋白質に対し、pH 等の反応条件をコントロールすることにより、アミノオキシ誘導体を N 末端アミノ基特異的に導入するガルトナー (Gaertner) らの方法 (Bioconjugate Chem, 1996, 7, 38-44) などが挙げられる。一般的なトリクロロ-s-トリアジン法 (Trichloro-s-triazine)、カルボキシイミダゾール法 (carboxylimidazole)、サクシンイミドイルサクジネート法 (succinimidyl su

ccinate) 等の官能基を導入したリガンドによる L y s 残基側鎖アミノ基修飾法などへのランダム修飾法によっても導入することができるが、このような方法は選択性が乏しく生理活性蛋白質の活性を阻害する可能性があり好ましい方法ではないのであるが、生理活性蛋白質の生物活性への影響が少なければ本発明の方法に適應することも可能である。

## 【0077】

また、糖鎖がリガンドとなる場合には、細胞培養による生産系において N 結合あるいは O 結合糖鎖型蛋白質を調製することによりそのままりガンドー蛋白質複合体とすることもできる。この場合には発現された糖鎖型蛋白質の糖鎖をさらに修飾あるいは特定の糖鎖を除去することにより理想的なりガンドとすることも可能である。

一方、低分子薬物あるいはキャリアーへのリガンド導入法としては、修飾可能な薬物やキャリアーの官能基にあわせた修飾法を選択する以外に、その薬理作用を細胞内外で効率よく発揮させるための分解のしやすさ、つまりプロドラッグ的なリガンドのはずれやすさについても考慮する必要がある。このための手段としては、臭化シアン法、過ヨウ素酸酸化法、カルボジイミド法、グルタルアルデヒド法、混合酸無水物法、SPDP 試薬法など種々の方法が挙げられる。

## 【0078】

本発明のスクリーニング方法を実施するに当たっては、前記した実験例に示されるように個々の速度論的な値を実験により決定してゆき本発明が開示した指標に基づいて最適なりガンドを選択してゆくことができる。しかし、個々の速度論的な値を決定してゆくことは正確で定量的な実験を行わなければならない。前記した実験方法に則した方法に本発明の方法が限定されるものではない。本発明の精神に反しない限り、より簡便な方法によりリガンドの最適化をおこなうことができることは当業者にはよく理解されるところである。

## 【0079】

本発明の開示に基づく本発明のより簡便なより具体的なスクリーニング方法としては、例えば、次のような方法を挙げることができる。

## 【0080】

細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプターを発現する遊離細胞あるいは培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質を洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化リガンドの結合量が、当該高親和性リガンドそのものの非標識体を初期に添加した場合の結合量に比べて高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングすることができる。

# 【0081】

また、細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質に対する結合親和性を有するリガンド又はリガンドで修飾された物質を、当該レセプターを発現する遊離細胞あるいは培養細胞の存在下でインキュベートした後、細胞表面に結合しているリガンド又はリガンドで修飾された物質をキレート剤入りのバッファー又は酸性バッファーで洗浄した後、当該レセプターに対する標識化されたりガンドを添加して細胞内への取り込みを抑えた低温下でインキュベートし、細胞表面への標識化されたりガンドの結合量が、レセプター結合後の解離速度定数と内在化速度定数の比が1以上であるリガンドを添加した場合の結合量に比べ高くなるリガンド又はリガンドで修飾された物質をスクリーニングすることができる。

# 【0082】

このように、速度論的に絶対的な値を決定することなく、本発明の開示に基づいて相対的な指標から最適なりガンドを選択することができる方法を提供することも本発明に包含されるものである。

このように本発明においては内在化回避能を有するリガンドをスクリーニングする条件 ( $k_{off}/k_{int} > 1$ ) では、出来るだけ  $k_{off}$  が大きいもの、即ち結合親和性 ( $1/K_d = k_{on}/k_{off}$ ) が低いものを選択していくことになるのであるが、結合親和性の強さは標的組織に対するターゲティング効率に直接的な相関を有するものであるから、ターゲティング型製剤であるためにはある程度の結合親和性を保持していることが前提となる。具体的には、リガンドあ

るいはリガンド又は当該リガンドで修飾された物質のレセプターによる組織や臓器が本来所有する処理能力である固有クリアランス、即ち、 $R_t * k_{int} / K_d$ （ただし、 $R_t$ はレセプター密度を示す。）で表される値が、他の組織や臓器での固有クリアランスより大きくなければならない。

## 【0083】

実際、リガンドの速度論パラメーター変化による体内動態シミュレーションを検討してみた。シミュレーションに使用した $(Gal)_3$ リガンドの $k_{on}$ 、 $k_{deg}$ の値をそのままにしておいて、 $k_{int}$ の値を $1/10$ 、 $1/100$ に低下させて固定し、 $k_{off}$ の値を $(Gal)_3$ リガンドの値の $10$ 倍、 $100$ 倍と変化させた場合の肝細胞外液中のIL-2濃度推移は、いずれも $k_{off}$ の値が $10$ 倍以上となるとその滞留性が低下した。これは、 $k_{off}$ の値のみに着目してその値を高くすることにより内在化回避能( $k_{off}/k_{int}$ )を高く設定しすぎたために、その $k_{off}$ の値から算出される結合親和性( $1/K_d$ )が低くなりすぎて標的に対するターゲティング効率が低下し、他の臓器での固有クリアランスがASGP-Rによる固有クリアランスを超えてしまったためであると考えられる。このシミュレーションの結果からすると、ASGP-Rをターゲットとした場合におけるリガンドの $k_{on}$ が一定であると仮定すると、その $k_{off}$ が $10$ 倍となった場合の $K_d$ 値(約 $3.5$  mM)よりも低くなければならないことになり、リガンドが標的に対するターゲティング効率を保持しながら、結合回避能を有する為には、その $K_d$ 値が $10$  mM以下、より望ましくは $3.5$  mM以下となる結合親和性を有していなければならないということになる。

## 【0084】

前記した本発明のスクリーニング方法を肝実質細胞のASGP-Rに対する場合を例にしてより具体的に説明する。

まず、 $37^{\circ}\text{C}$ で数分間培養肝細胞と各種リガンド( $(Gal)_3$ を含む)とをインキュベートし、レセプター及び細胞表面への結合画分を氷冷したキレート剤入り又は酸性バッファーで洗浄した後、 $4^{\circ}\text{C}$ にて最も高親和性のリガンドを有する $^{125}\text{I}$ -アシアロオロソムコイド(ASOR)と一定時間インキュベートし、 $^{125}\text{I}$ -ASORの結合量が $(Gal)_3$ を添加したものよりも高いリガン



ド、即ち (Gal)<sub>3</sub> よりも内在化されにくいリガンドをスクリーニングすることができる。なお、スクリーニングに用いるリガンドは、分枝したガラクトース (Gal)、あるいはN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を有し、肝実質細胞上のASGP-Rに対する解離定数が10 mM以下であるようなある程度の結合親和性を有するものを用いることが好ましい。

#### 【0085】

例えば、ASGP-Rへの結合親和性がある程度小さいリガンドとするため、2つの一級アミノ基を有する骨格部とラクトースとのNaBH<sub>3</sub>CNによる還元アミノ化を行い、骨格部としてはリジン、オルニチン類を用いたリガンドを作製して、前記した本発明のスクリーニング方法を行うことができる。

#### 【0086】

また、前記した方法により、前記した実験で用いた (Gal)<sub>3</sub> よりも内在化回避能が高い (Gal)<sub>2</sub> リガンドを得た。この (Gal)<sub>2</sub> リガンド修飾IL-2 ((Gal)<sub>2</sub>-IL-2) とこれまでの最適リガンド修飾体である (Gal)<sub>3</sub>-IL-2 についてマウス静脈内投与後の血漿中濃度推移を比較した結果、(Gal)<sub>2</sub>-IL-2の方が (Gal)<sub>3</sub>-IL-2 に比べ明らかに血中濃度が高く、血中滞留性の向上が観察された。これは (Gal)<sub>2</sub>-IL-2の方がASGP-Rへ結合後、細胞内へより内在化されにくく肝臓での消失がより抑えられているためであると考えられる。

さらに、培養肝細胞を用いた (Gal)<sub>3</sub>-IL-2 と (Gal)<sub>2</sub>-IL-2 のパルスチェイス法による細胞内取り込み実験を行い、それぞれのk<sub>int</sub> 及びk<sub>off</sub> を算出した結果、(Gal)<sub>2</sub>-IL-2のk<sub>off</sub>/k<sub>int</sub> は (Gal)<sub>3</sub>-IL-2のそれよりも高い値となり、その内在化回避能がより高いことが示された。

#### 【0087】

また、(Gal)<sub>2</sub> 及び (Gal)<sub>3</sub> リガンドのASGP-Rに対する結合親和性を測定するため、ASORの培養肝細胞に対する結合阻害実験を行った結果、(Gal)<sub>2</sub> リガンドの結合阻害定数(K<sub>i</sub>)、即ちK<sub>d</sub>値は (Gal)<sub>3</sub> リガンドのそれよりも大きく、しかもその値は10 mM以下であることがわかった

すなわち、 $(Gal)_2$  リガンドは  $(Gal)_3$  リガンドを上回る内在化回避能を有し、その結合親和性もターゲティングが可能な強さに保たれていることが示された。

#### 【0088】

一方、前記した相対比較法によるスクリーニング法とは異なり、より定量的に  $K_d$  及び  $k_{int}$ 、 $k_{off}$  を概算することによって適度な結合親和性と内在化回避能を共に有するリガンドをスクリーニングする方法もあり、この方法も本発明の具体例のひとつである。この方法を肝実質細胞の  $ASGP-R$  に対する場合を例にして具体的に説明する。

まず、培養肝細胞に対しラベル化した高親和性の  $ASOR$  の結合阻害実験を各リガンドについて行い、スキッチャードプロット解析によりそれぞれの結合阻害定数 ( $K_i$ )、即ち結合解離定数 ( $K_d$ ) を算出し、 $K_d$  値が  $10\text{ mM}$  以下のリガンドを選択する。次に、ラベル化標準リガンドについて  $R_t$  (レセプター密度) も算出する。なお、検討する種々のリガンドについてもラベル体を使用する場合には、通常行われる結合実験により各  $K_d$  値を算出する。

#### 【0089】

次に、選択されたりガンド又は当該リガンドで修飾された物質の  $^{125}\text{I}$  ラベル体を低温下 ( $4^\circ\text{C}$ ) で2時間程度インキュベーションして細胞膜上のレセプターあるいは蛋白質へ結合させた後、冷却した等張性バッファーで洗浄して非特異的な結合画分を除く。次に、細胞をエンドサイトーシスによる取り込みによるリガンドの分解が起こらない範囲内の時間、好ましくは10分から30分の範囲内で一定時間、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートする。インキュベート後すぐに細胞を  $4^\circ\text{C}$  で冷却後、培地をサンプリングする (これを①とする。)。続いて冷却したキレート剤含有または酸性バッファーで数回洗浄して特異的な結合画分を細胞から解離させた後 (この時を②とする。)、再度冷却して等張性バッファーで数回洗浄して非特異的な結合画分をも解離させる。洗浄後の細胞を  $-80^\circ\text{C}$  で30分程度冷却後、 $0.1\text{ N NaOH}$  溶液、あるいは  $\text{Tween}$  液など細胞膜溶解剤含有液を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で2時間程度インキュベートすることにより溶解させた細胞液を得る (これを③とする。))。

## 【0090】

上記した①及び③の溶液中のラベル体量を、放射性カウンターあるいは蛍光光度計で測定することにより、細胞外液中への解離量（①）及び細胞内への内在化量（③）を算出する。なお、同時に37℃でのインキュベート時間0時間での表面結合量（②）を測定する。なお、サンプルリガンドに過剰量（100当量以上）のコールドリガンドを同時添加して同様な取り込み実験を行うことにより、レセプターを介さない画分量を差し引くことがより好ましい。

以上の結果から算出された一定時間経過後の累積解離量（ $X_{off}$ ）、累積内在化量（ $X_{int}$ ）を、表面結合量のAUC（時間ゼロにおける表面結合量と経過時間後の結合量の時間推移下面積（台形法））で割ることにより、 $k_{off}$ 、 $k_{int}$ を算出する。求めた $k_{off}/k_{int}$ が1より大きいものが目的の候補リガンドとなる。

なお、リガンドのラベル化は生理活性蛋白質などの薬物と結合させ、リガンド又は薬物を $^{125}I$ でラベル化する方法、あるいはリガンドにTyrを導入して $^{125}I$ ラベル化させたり、FITCなどで修飾するなどの方法が考えられるが、 $K_{off}$ 、 $K_{int}$ を算出するためには薬物と結合させてラベル化する方法がより好ましい。

## 【0091】

本発明のスクリーニング方法におけるリガンド又はリガンドと結合した薬物を標識化する方法としては、前記した $^{125}I$ のような放射性同位体を用いてもよいが、本発明の方法はこのようなラジオアイソトープによる標識化に限定されるものではなく、FITCやアクリジン誘導体などの蛍光ラベルを使用することもできる。

## 【0092】

本発明は、標的組織の細胞の特定のレセプターへの結合を介した内在化回避能と結合親和性とを指標としてリガンドをスクリーニングする方法を提供するものである。そして、本発明は当該スクリーニング方法を実施するための装置及び実施するに必要な試薬を含有してなるスクリーニング用のキットを包含するものである。

本発明のスクリーニング用のキットとして重要なものは、前記の試験においてリガンドとして使用した  $(Gal)_3$  のようなリガンドを標準比較品として含有している試薬キットである。このような標準比較品を使用することにより、本発明のスクリーニング方法をより簡便にかつ短時間で行うことができる。

【0093】

さらに、本発明は本発明のスクリーニング方法により得られたリガンドを包含するものである。本発明のリガンドはこれをそのまま治療用の医薬組成物の成分として使用することもできるが、通常は当該リガンドを生理活性蛋白質などの薬物を結合させてDDS製剤として使用することができる。

したがって、本発明は本発明のスクリーニング方法により得られたリガンドを含有している生理活性物質及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物をも提供するものである。

【0094】

本発明の医薬組成物の有効投与量は、使用する薬物としての生理活性物質により適宜調整することができる。本発明の医薬組成物における有効成分の投与量は、生理活性物質をそのまま医薬組成物の成分として使用する従来の医薬組成物に比べてより少量でよい。それは、有効成分を本発明のリガンドで修飾することにより、標的組織により多量に集積し、標的組織の細胞により代謝、分解されることが少ないからである。しかも、標的組織以外の組織においては、薬物の濃度をより低くすることができるので、薬物による副作用も少なくなる。

したがって、本発明の医薬組成物は、従来の製剤化方法では大量投与しなければならなかった薬物を、極めて少量の投与ですむことになるために、IL-2、IL-6、インターフェロンなどのサイトカイン類をはじめとする生理活性蛋白質を有効成分とする新しい医薬組成物を提供するものであり、これらの有効成分を用いた治療分野を拡大することができるものである。

【0095】

本発明の医薬組成物の投与方法としては、本発明のリガンドで修飾されていない薬物の投与方法と同様な方法で投与することができ、特定の投与方法に限定されるものではない。

【0096】

【実施例】

次に実施例により具体的の本発明の方法を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0097】

実施例1 (結合阻害実験)

各リガンドによるASORのマウス肝細胞への結合阻害実験を、Biessen らの方法 (Biessen EAL et al., J.Biol.Chem, 271 (45): 28024-28030 (1996)) に準じて行った。

2%BSAを含むD-PBSに肝実質細胞 (4 mLのファルコンチューブ (Falcon tube) 中に  $0.6 \sim 1.0 \times 10^6 / 0.5 \text{ mL}$ 、氷浴中) を取り、それに2%BSAを含むD-PBSで種々の濃度にした阻害剤0.25 mLを加えた。これに、2%BSAを含むD-PBS中の $^{125}\text{I}$ -ASOR 0.25 mL (22 nM) を加え、4℃で2時間ゆっくり攪拌した。

50Gで1分間遠心分離し、上澄みを捨て、2%BSAを含むD-PBSを加えて攪拌した後、再度50Gで1分間遠心分離し、上澄みを捨てた。これをもう一度繰り返した後、 $\gamma$ カウンターで測定した。

その後、これに10%SDSを含む0.1N NaOHを1 mL加えて蛋白質濃度を蛋白質アッセイキット (BioRad社製) を用いてLowry法により測定した。

【0098】

さらに、ASORのマウス分離肝細胞への結合に対する、2種のリガンドの結合阻害実験を上述の方法に準じて行った。

その結果、 $(\text{GalNAc})_3$ 、 $(\text{Gal})_3$  共に添加濃度の上昇に伴い、 $^{125}\text{I}$ -ASORがほぼ一相性で解離した。計3回の解離データをそれぞれ非線形のシングルサイトモデル (single site model) を用いて解析し、結合阻害定数 ( $K_i$ ) を算出した。結果を前記した表1に示す。

2種のリガンドの阻害能には大きな違いが見られた。 $(\text{GalNAc})_3$  の  $K_i$  値はASORのその約230倍 ( $1.7 \mu\text{M}$ ) であったのに対し、 $(\text{Gal})_3$  のそれは約50000倍 ( $350 \mu\text{M}$ ) であった。なお、結合阻害定数 ( $K$

i) は結合解離定数 ( $K_d$ ) と考えられるため、これらの結果から各リガンドの  $K_d$  値が算出された。

【0099】

## 実施例2 (薬物の抗腫瘍効果)

6週齢のB10D2系雌マウス(1群7匹、7群の計49匹)にS908系の腫瘍細胞  $7.5 \times 10^4$  個を移植して腫瘍を発生させた。腫瘍細胞移植後7日目から5日間、1日2回計10回薬物を投与した。第1群目はコントロールとして生理食塩水を投与し、第2群目にはIL-2を1回当たり  $1.0 \times 10^4$  単位 ( $150 \mu\text{l}$ ) を投与(低用量群)し、第3群目にはIL-2を1回当たり  $4.0 \times 10^4$  単位 ( $150 \mu\text{l}$ ) を投与(高用量群)し、第4群目には  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  を1回当たり  $1.0 \times 10^4$  単位 ( $150 \mu\text{l}$ ) を投与(低用量群)し、第5群目には  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  を1回当たり  $4.0 \times 10^4$  単位 ( $150 \mu\text{l}$ ) を投与(高用量群)し、第6群目には  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  を1回当たり  $1.0 \times 10^4$  単位 ( $150 \mu\text{l}$ ) を投与(低用量群)し、第7群目には  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  を1回当たり  $4.0 \times 10^4$  単位 ( $150 \mu\text{l}$ ) を投与(高用量群)した。

腫瘍細胞を移植してから28日目に解剖して腫瘍の治癒、大きさなどを調べた。薬効の統計解析は多重検定法により行なった。抗腫瘍効果については、1パラメーターANOVA (Dunnett's-t-test)、治癒例数及び死亡例数については、Fisher's protected LSDにて行なった。結果を前掲した表2に示す。

【0100】

抗腫瘍効果については、 $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  群は高用量、低用量ともに対象群に対し有意な効果を認めた。これに対しIL-2群では高用量においてのみ対象群に対し有意な効果が認められ、 $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  群では2用量とも有意差が認められなかった。治癒例数については、 $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  群においてのみ高用量、低用量ともに対象群、IL-2群、及び  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  群に対し有意な効果を認めた。死亡例数については低投与量においてのみ  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  群、IL-2群、及び  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  群がいずれも対象群に対し有意な効果を認めた。以上の結果を総合する

と、3検体の抗腫瘍効果は  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2} > \text{IL-2} > (\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  の順に強い傾向にあることが示された。

#### 【0101】

#### 実施例3 (リガンドの体内動態)

6週齢の雄マウス (C57BL/6、CRJ社) にクロラミンT法により  $^{125}\text{I}$  でラベルした  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  ( $6.9 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ ) 及び  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  ( $2.0 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ ) をIL-2換算で  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  尾静脈投与し、一定時間 (20秒、40秒、60秒、90秒、120秒、180秒) 経過後、採血及び主要臓器 (心臓、肝臓、腎臓、肺、脾臓、胃、小腸、大腸、筋肉) の採取を行なった。血漿は採取後、 $10000 \text{ rpm}$  で3分間遠心分離することにより得た。検体の各組織中濃度は、血漿についてはTCAによる沈殿画分を、各臓器についてはそのままのものをγカウンターにて測定することにより求めた。

#### 【0102】

$(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ 、及び  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  の  $^{125}\text{I}$  - 標識体静注体内動態検討後の主要臓器の取り込みクリアランス (3分の取り込み量/3分までのAUC) と  $K_p$  値 (3分の取り込み量/3分での血漿中濃度) を、それぞれ図14及び図15に示す。

この結果、 $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  ともに体重  $1 \text{ kg}$  当たりにおける肝取り込みクリアランス (CLuptakeLi)、肝  $K_p$  ( $K_{p \text{ liver}}$ ) が他の臓器のそれに比べ高く、どちらのリガンドについても全身消失並びに分解を決めている主な臓器は肝臓であることがわかった。

両者の臓器  $1 \text{ g}$  当たりのCLuptakeLi ( $\text{ml}/\text{min}/\text{g}$  肝臓) は  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  が  $0.34$ 、 $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  が  $0.50$  と違いが見られ、インビボにおいて  $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$  の方が  $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$  に比べ取り込み効率が約  $1.5$  倍高いことが示された。

#### 【0103】

#### 実施例4 (マウス肝細胞の分離及び培養)

肝実質細胞の分離は、Berryらの方法 (Berry M.N. et al., J.Cell.Biol. 43:

506-520 (1969)) を改良して行なった。即ち、6～10週齢の雄マウス (C57BL/6, CRJ社) のコラゲナーゼ還流後の細胞分散液を、濾過、遠心後、プレーティングせずにファルコンチューブ中、4℃で放置した。同様に処理したマウス2～3匹分の細胞懸濁液を合わせた後、50G×1分間で3～4回遠心分離を行うことにより、バイアビリティ (Viability) が90%以上であるマウス肝実質細胞を  $6.0 \times 10^7 \sim 1.1 \times 10^8$  個得た。

細胞をストレプトマイシン ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ )、ペニシリン ( $100 \text{U}/\text{ml}$ )、Hepes ( $20 \text{mM}$ )、及びFBS (10%, Cat.No.26140-0791, Gibco社製) を含有したD-MEM (Cat.No. 31600-091, Gibco社製) 培地 (pH 7.4) に懸濁後 ( $3.0 \times 10^5/\text{ml}$ )、12ウエルのコラゲナーゼコートマイクロプレート (Code.No. 4815-010, IWAKI社製) に1mlずつ添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 中で一晩培養して取り込み実験に用いた。

#### 【0104】

#### 実施例5 (パルスチェイス法によるマウス肝細胞への取り込み実験)

パルス追跡法によるマウス肝細胞への取り込み実験は、桑原らの方法 (Kuwabara T., et al., Am.J.Physiology 193: 73-84 (1996)) を参考にして行なった。<sup>125</sup>I-ラベル体は前記した実施例3において用いたものと同様のサンプルを使用した。

実施例4で得られたマウス肝細胞を12ウエルのプレートに取り、これに1mlのD-PBS (pH 7.4) を加えて4℃でインキュベートした後、D-PBSで2回洗浄した。これを、0.1%BSA及び25mMHepes (pH 7.4) を含有する氷冷したD-MEM 0.5mlで2回洗浄した。

これに、200μlの氷冷した<sup>125</sup>I-(Gal)<sub>3</sub>-IL-2又は(GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2 (IL-2として $0.65 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; 42nM) の0.1%BSA及び25mMHepes (pH 7.4) を含有するD-MEM溶液を加えた。さらに、200μlの氷冷した0.1%BSA及び25mMHepes (pH 7.4) を含有するD-MEMを、200mMのGalNAcの存在下又は非存在下に加えた。これらを4℃で2時間放置した。

#### 【0105】



放置後、0.1% BSA及び25mMHepes (pH7.4) を含有する500 $\mu$ lの氷冷したD-MEMで4回洗浄した。0.1% BSA及び25mMHepes (pH7.4) を含有する500 $\mu$ lのD-MEMを加えて37℃にし、37℃で、それぞれ0分、1分、2分、3.5分、5分、7分、10分、20分、又は30分間保った後、直ちに氷浴で4℃に冷却した。得られた溶液を各々2つに分け、そのひとつを次のように処理した。

## 【0106】

そのひとつを150 $\mu$ lづつさらに分け、ひとつの150 $\mu$ lについて<sup>125</sup>Iの量を定量した。この定量値を⑥とした。

他の150 $\mu$ lについては、これに150 $\mu$ lの20%TCAを加え、4℃で10分間放置した後、3500rpmで10分間遠心分離して沈澱物を分離した。  
溶液の<sup>125</sup>Iの量を定量した。この定量値を⑦とした。

## 【0107】

氷浴で4℃に冷却したときの残りの溶液のほうは、これを0.1%BSA及び25mMHepes (pH7.4) を含有する500 $\mu$ lの氷冷したD-MEMで2回洗浄した後、氷冷した1mlのD-PBS (pH7.4) を加え、4℃で10分間放置し、20mM EGTA (pH7.4) を含有した氷冷したD-PBSを1ml加え4℃で10分間放置した。このときの<sup>125</sup>Iの量を定量し、この定量値を②とした。

さらに、氷冷した1mlのD-PBS (pH7.4) を加え、このときの<sup>125</sup>Iの量を定量し、この定量値を③とした。

次いで、-80℃で30分以上放置し、これに0.5mlの0.1N-NaOHを加え、37℃で2時間放置した後、このときの<sup>125</sup>Iの量を定量し、この定量値を④とした。

さらに、0.25mlの0.1N-NaOHを加え、洗浄した後、このときの<sup>125</sup>Iの量を定量し、この定量値を⑤とした。

## 【0108】

以上の定量値から各値を次の式により算出した。

$$[\text{内在化された物質の量}] = ④ + ⑤$$

$$[\text{解離された物質の量}] = (⑥ - ⑦ * 2) * 500 / 150$$

$$[\text{分解された物質の量}] = ⑦ * 500 / 150$$

$$[\text{細胞表面に結合している物質の量}] = ② + ③$$

なお細胞中の総蛋白質量は、取り込み実験に用いない一晚培養後のプレート中の3 well についてそれぞれLowry法 (Bio Rad社製) により定量し、平均値を算出した。

[0109]

この試験において用いる微分式は次のとおりである。

$$dLR_s / dt = k_{on} R_t * L - (k_{off} + k_{int}) * LR_s$$

$$dLR_i / dt = k_{int} * LR_s - k_{deg} * LR_i$$

$$dX_{deg} / dt = k_{deg} * LR_i$$

実験は、トレーサーとしてラベル体を用いて行なったのでレセプター数 ( $R_t$ ) は一定とした。また、リガンド-IL-2ハイブリッド体の媒体中濃度 ( $L$ ) の減少はわずかであったので、 $L$  は一定とした。計3回の実験を行ない、1回毎 ( $n=3$ ) に解析して速度論的パラメーターを算出した。

即ち、得られたラジオアクティビティー (Radioactivity) 量は全て添加液濃度 ( $cpm/\mu l$ ) 及び各実験毎に定量した1ウエル中の総蛋白質量 ( $mg/\text{ウエル}$ ) で割ることにより、分布容積 ( $\mu l/mg$  細胞蛋白質) に換算した。なお添加液濃度は各実験毎にTCA沈殿法により算出したインタクト (Intact) な割合を掛けて補正した。データはすべてGalNAc無添加の値からGalNAc添加の値を差し引くことによりASGPRを介した特異的な取り込み由来のものとし、各時間における細胞表面への結合量 (Bind)、取り込み量 (Inter)、分解量 (Deg)、解離量 (Dis) を平均値として算出した。次に結合の  $AUC_{0 \sim t}$  ( $\mu l * min/mg$ ) に対する取り込み ( $\mu l/mg$ ) 及び分解 ( $\mu l/mg$ ) の積分プロットについて、非線形最小自乗法 (Mult i、重み2) (K.Yamaoka, et al., J.Pharmacobio-Dyn.4: 879-885 (1981)) による最適化を行ない内在化及び解離速度定数 ( $K_{int}$ 、 $K_{off;min}$ )

-<sup>1</sup>) をそれぞれ求めた。

# 【0110】

実施例 6 (連続インキュベーション法によるマウス肝細胞への取り込み実験)

実施例 4 で得られたマウス肝細胞を 12 ウェルのプレートに取り、これに 1 ml の D-PBS (pH 7.4) を加えて 4℃ でインキュベートした後、D-PBS で 2 回洗浄した。

これに、200 μl の氷冷した <sup>125</sup>I-(Gal)<sub>3</sub>-IL-2 又は (GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2 (IL-2 として 0.65 μg/ml; 42 nM) の 0.1% BSA 及び 25 mM Hepes (pH 7.4) を含有する D-MEM 溶液を加えた。さらに、200 μl の氷冷した 0.1% BSA 及び 25 mM Hepes (pH 7.4) を含有する D-MEM を、200 mM の GalNAc の存在下又は非存在下に加えた。

これを、37℃ で、それぞれ 1 分、5 分、10 分、20 分、30 分、60 分、120 分、又は 240 分間保った後、直ちに氷浴で 4℃ に冷却した。得られた溶液を各々 2 つに分け、そのひとつを次のように処理した。

# 【0111】

そのひとつを 150 μl づつのさらに分け、ひとつの 150 μl について <sup>125</sup>I の量を定量した。この定量値を⑥とした。

他の 150 μl については、これに 150 μl の 20% TCA を加え、4℃ で 10 分間放置した後、3500 rpm で 10 分間遠心分離して沈澱物を分離した。

溶液の <sup>125</sup>I の量を定量した。この定量値を⑦とした。

# 【0112】

氷浴で 4℃ に冷却したときの残りの溶液のほうは、これに 1 ml の氷冷した D-PBS (pH 7.4) を加え、4℃ で 10 分間放置し、20 mM EGTA (pH 7.4) を含有した氷冷した D-PBS を 1 ml 加え 4℃ で 10 分間放置した。このときの <sup>125</sup>I の量を定量し、この定量値を②とした。

さらに、氷冷した 1 ml の D-PBS (pH 7.4) を加え、このときの <sup>125</sup>I の量を定量し、この定量値を③とした。

次いで、 $-80^{\circ}\text{C}$ で30分以上放置し、これに0.5 mlの0.1 N-NaOHを加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で2時間放置した後、このときの $^{125}\text{I}$ の量を定量し、この定量値を④とした。

さらに、0.25 mlの0.1 N-NaOHを加え、洗浄した後、このときの $^{125}\text{I}$ の量を定量し、この定量値を⑤とした。

#### 【0113】

以上の定量値から各値を次の式により算出した。

$$[\text{内在化された物質の量}] = \text{④} + \text{⑤}$$

$$[\text{分解された物質の量}] = \text{⑦} * 500 / 150$$

$$[\text{細胞表面に結合している物質の量}] = \text{②} + \text{③}$$

なお細胞中の総蛋白質量は、取り込み実験に用いない一晚培養後のプレート中の3 well についてそれぞれLowry法 (Bio Rad社製) により定量し、平均値を算出した。

#### 【0114】

合計3回の実験を行なった連続インキュベーション法によるデータの解析は、1回毎 ( $n=3$ ) のデータについて解析し、速度論的パラメーターを算出した。

得られたラジオアクティビティー (Radio activity) 量は前記の実施例4と同様に全て添加液濃度 ( $\text{cpm}/\mu\text{l}$ ) 及び各実験毎に定量した1ウェル中の総蛋白質量 ( $\text{mg}/\text{ウェル}$ ) で割ることにより、分布容積 ( $\mu\text{l}/\text{mg}$  細胞蛋白質) に換算した。なお、添加液濃度は各実験毎にTCA沈殿法により算出したインタクト (Intact) な割合を掛けて補正した。データはすべてGalNAc無添加の値からGalNAc添加の値を差し引くことによりASGP-Rを介した特異的な取り込み由来のものとし、各時間における細胞表面への結合量 (Bind)、取り込み量 (Inter)、分解量 (Deg) を平均値として算出した。得られたデータについてNapp (Numeric Analysis Program for Pharmacokinetics) (H.Hisaka & Y.Sugiyama, J.Pharmacokine.Biopharm, (1999), 26, in press) を用いた最適化を行なった。最適化は前記の実施例4で得られた $K_{int}$ と $K_{off}$ の比を $(\text{Gal})_3\text{-IL-2}$ 及び $(\text{GalNAc})_3\text{-IL-2}$ についてそれぞれ固定し、非線形最小自乗法にルング・クッタ・

ギル (Runge Kutta Gill) 法を組み合わせることにより行ない、 $K_{int}$  ( $\text{min}^{-1}$ )、 $K_{off}$  ( $\text{min}^{-1}$ )、 $K_{deg}$  (解離速度定数、 $\text{min}^{-1}$ )、及び  $K_{on}Rt$  (結合クリアランス;  $K_{on} * Rt$ 、 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ ) を算出した。

【0115】

#### 実施例7 (薬物動態のシュミレーション)

(Gal)<sub>3</sub>-IL-2、(GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2 及び IL-2 の薬効の違いを説明する為、生理学的な知見に基づいた薬物動態モデルを構築した。

このシュミレーションで使用したパラメーターは前記の実施例4及び5の実験で得られた薬物動態及び速度論パラメータ並びに生理学的パラメータを用いた。リガンド修飾 IL-2 はともに主要な分布並びに消失臓器が肝臓であるため、肝細胞外液と血液循環系からなる単純なコンパートメントの生理学的な薬物動態モデルとした。これをもとに Stella (Bogen et al., Science, 246: 138-142 (1989)) を用いてシュミレーションを行い、体内動態の予測計算を行なった。

【0116】

IL-2 については実験的に観察された肝臓における非特異的な消失クリアランスをモデルに加え、ASGP-R への結合クリアランスを0とした。なお、各画分中のリガンド-IL-2 ハイブリッド体濃度に関する速度式を下記に示す。

(血漿中画分)

$$dC_b/dt = (-Q_H * C_b + Q_H * C_e) / V_b$$

(肝細胞外液中画分)

$$dC_e/dt = (Q_H * C_b - k_{on}RT * C_e * F + k_{off} * X_s - Q_H * C_e) / V_e$$

(肝細胞表面結合画分)

$$dX_s/dt = k_{on}Pt * C_e * F - (k_{off} + k_{int}) * X_s$$

(肝細胞内画分)

$$dX_i/dt = k_{int} * X_s - k_{deg} * X_i$$

(分解画分)

$$dX_{deg}/dt = k_{deg} * X_i$$

(レセプター占有率)

$$\text{Receptor Occupancy} = C_e / (K_d + C_e)$$

【0117】

前記した表3に記載の使用したパラメーターのうち、(a)については(Gal)<sub>3</sub>-IL-2の取り込み実験データから得られた値を、(b)の肝臓以外の臓器による取り込みクリアランスについては体内動態実験で得られた(Gal)<sub>3</sub>-IL-2の腎取り込みクリアランスの値を用いた。(c)のIL-2についてのみ肝クリアランス(CL<sub>NSP</sub>)は、実施例5で得られたIL-2の非特異的な取り込みによる分解速度と(Gal)<sub>3</sub>-IL-2の分解速度との比がそれぞれの肝固有クリアランスの比に等しいとにおいて計算した。ここで(Gal)<sub>3</sub>-IL-2の固有クリアランスは、

$$CL_{int\ h} (Gal) = F * k_{on} R_t (Gal) * k_{int} (Gal) / (k_{off} (Gal) + k_{int} (Gal))$$

にて表される(CL<sub>int h</sub>; 肝固有クリアランス、F; 換算定数)。

【0118】

また、使用したパラメーターのうち肝細胞外容積V<sub>e</sub>は、その容積が臓器重量の約20%であるという宮内らの報告(S.Miyauchi, et al., J.Pharmacokin. Biopharm. 15: 25-38 (1987))より算出した。

Q<sub>H</sub> (肝血漿流速) 及びF (インビトロで得られたk<sub>on</sub> R<sub>t</sub> (結合クリアランス) のインボボモデルへの換算定数) は、以下のようにして求めた。

即ち、<sup>125</sup>I 標識体静注後の体内動態検討により得られた(Gal)<sub>3</sub>-IL-2、(GalNAc)<sub>3</sub>-IL-2 それぞれの肝取り込みクリアランスCL<sub>uptake Li</sub>は投与初期での肝臓への分布を測定している為、インビトロの実験で算出した結合クリアランス(k<sub>on</sub> R<sub>t</sub>)を主に反映していると考えられる。肝取り込みに関する固有クリアランス(CL<sub>int</sub>, Uptake)は、CL<sub>int</sub>, uptake = k<sub>on</sub> R<sub>t</sub> × Fとなるべきである。従って、ウェルステアードモデル(Well-stirred model)に従えば下記のようになる。

$$CL_{uptakeLi} = \frac{Q_H \times CL_{int, uptake}}{(Q_H + CL_{int, uptake})}$$

ただし、 $CL_{int, uptake} = F \times (k_{on} R_t, \text{ピトロ})$ である。

#### 【0119】

これについて  $(Gal)_3-IL-2$ 、 $(GalNAc)_3-IL-2$  それぞれの連立方程式を解くことにより  $Q_H$  及び  $F$  値を算出した。

また、 $IL-2$  依存性の  $CTL-2$  細胞を用いたインピトロの生物活性測定において修飾による生物活性の低下が見られなかったことから、リガンド- $IL-2$  及び  $IL-2$  の  $IL-2R$  に対する解離定数は全て同じ値 ( $K_d = 10 \text{ pM}$ ; 高親和性) に設定した。

#### 【0120】

##### 【発明の効果】

本発明は、持続時間が長いターゲティング型DDS製剤の簡便なスクリーニング方法を提供するものである。

本発明のスクリーニング方法で得られたリガンドは、生理活性作用を有する薬物と組み合わせて使用されることにより、薬物の標的細胞又は臓器中への集積効率を高め、しかも持続的な効果を発揮させることが可能なターゲティング型DDS製剤を構築することができる。即ち、生理活性蛋白質などの薬物を集中的に標的組織に集積させることができるのみならず、標的組織に集積した薬物が長時間に亘って滞留し、投与した薬物の多数を治療目的に使用することができる。投与した薬物の多くが生体内において代謝、分解されるために、従来大量に投与しなければならなかった薬物も、本発明のリガンドを使用することにより治療効果に必要な少量を投与すればよくなり、薬物による副作用も少なくすることができる。

また、薬物としては、必ずしも細胞外へ運搬させたい物に限らず、細胞内へ取り込ませたい薬物であってもよく、その場合には薬物としての毒性が高い為、他の臓器にはできるだけ分布させたくないもの、さらに、標的レセプター周辺へ集積後、できるだけ正常細胞よりも異常をきたした細胞へ取り込まれやすいものも

選択することができ、副作用の少ない投与形態とすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、細胞表面におけるリガンドとレセプターの速度論的モデルを示したものである。

【図 2】

図 2 は、マウス肝細胞における  $(Gal)_3-IL-2$  の細胞表面結合量 (●印)、細胞内在量 (□印)、分解生成物量 (×印) 及び細胞外量 (△印) を時間 (分) の経過と共に示したものである。

【図 3】

図 3 は、マウス肝細胞における  $(GalNAc)_3-IL-2$  の細胞表面結合量 (●印)、細胞内在量 (□印)、分解生成物量 (×印) 及び細胞外量 (△印) を時間 (分) の経過と共に示したものである。

【図 4】

図 4 は、マウス初代培養肝細胞への  $(Gal)_3-IL-2$  の取り込みの推移を示したものである。図 4 中の、黒丸印 (●) は細胞表面に結合したものを示し、黒四角印 (■) は細胞に取り込まれて内在化したものを示し、白三角印 (△) は分解生成物をそれぞれ示している。

【図 5】

図 5 は、マウス初代培養肝細胞への  $(GalNAc)_3-IL-2$  の取り込みの推移を示したものである。図 4 中の、黒丸印 (●) は細胞表面に結合したものを示し、黒四角印 (■) は細胞に取り込まれて内在化したものを示し、白三角印 (△) は分解生成物をそれぞれ示している。

【図 6】

図 6 は、マウス初代培養肝細胞への  $IL-2$  の取り込みの推移を示したものである。図 4 中の、黒丸印 (●) は細胞表面に結合したものを示し、黒四角印 (■) は細胞に取り込まれて内在化したものを示し、白三角印 (△) は分解生成物をそれぞれ示している。

【図 7】



図7は、生体内における薬物の速度論的モデルを示したものである。

【図8】

図8は、リガンド-IL-2ハイブリッド体の血漿中濃度のシュミレーションの結果を示したものである。図8の、太い実線は $(Gal)_3-IL-2$ を示し、細い実線は $(GalNac)_3-IL-2$ を示し、破線は未修飾IL-2をそれぞれ示している。

【図9】

図9は、リガンド-IL-2ハイブリッド体の肝細胞外液中濃度のシュミレーションの結果を示したものである。図9の、太い実線は $(Gal)_3-IL-2$ を示し、細い実線は $(GalNac)_3-IL-2$ を示し、破線は未修飾IL-2をそれぞれ示している。

【図10】

図10は、リガンド-IL-2ハイブリッド体のIL-2Rの占有率のシュミレーションの結果を示したものである。図10の、太い実線は $(Gal)_3-IL-2$ を示し、細い実線は $(GalNac)_3-IL-2$ を示し、破線は未修飾IL-2をそれぞれ示している。

【図11】

図11は、種々の $k_{int}$ 及び $k_{off}$ の値を有するリガンドを用いた場合の血漿中濃度の推移をシュミレーションした結果を示すものである。図の(A)は $k_{int}$ の値が $0.0896/min$ の場合、(B)は $k_{int}$ の値が $0.00896/min$ の場合、(C)は $k_{int}$ の値が $0.000896/min$ の場合を示している。

【図12】

図12は、種々の $k_{int}$ 及び $k_{off}$ の値を有するリガンドを用いた場合の肝細胞外液中濃度の推移をシュミレーションした結果を示すものである。図の(A)は $k_{int}$ の値が $0.0896/min$ の場合、(B)は $k_{int}$ の値が $0.00896/min$ の場合、(C)は $k_{int}$ の値が $0.000896/min$ の場合を示している。

【図13】

図13は、種々の $k_{int}$ 及び $k_{off}$ の値を有するリガンドを用いた場合のIL-2レセプターの占有率の推移をシュミレーションした結果を示すものである。図の(A)は $k_{int}$ の値が $0.0896/min$ の場合、(B)は $k_{int}$ の値が $0.00896/min$ の場合、(C)は $k_{int}$ の値が $0.000896/min$ の場合を示している。

【図14】

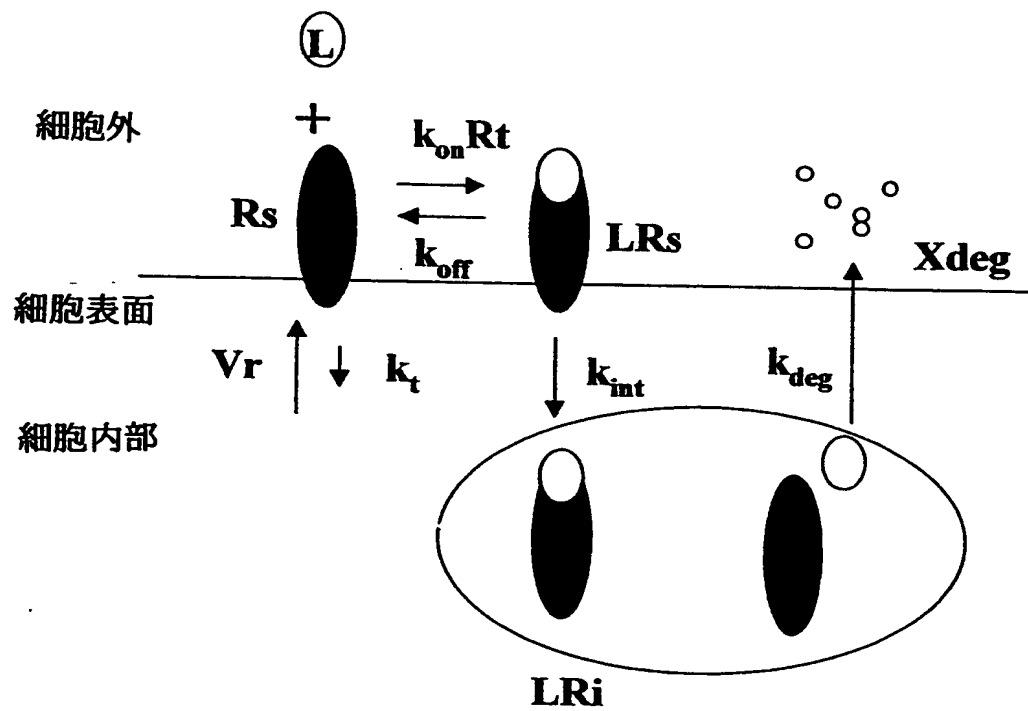
図14は、 $(Gal)_3-IL-2$ の各臓器における取り込みクリアランス(3分の取り込み量/3分までのAUC)と $K_p$ 値(3分の取り込み量/3分での血漿中濃度)を示したものである。

【図15】

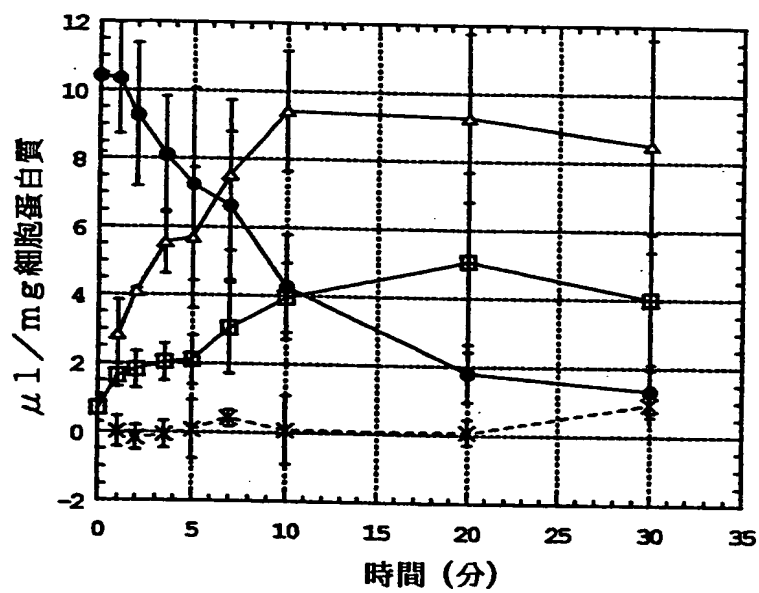
図15は、 $(GalNAc)_3-IL-2$ の各臓器における取り込みクリアランス(3分の取り込み量/3分までのAUC)と $K_p$ 値(3分の取り込み量/3分での血漿中濃度)を示したものである。

【書類名】 図面

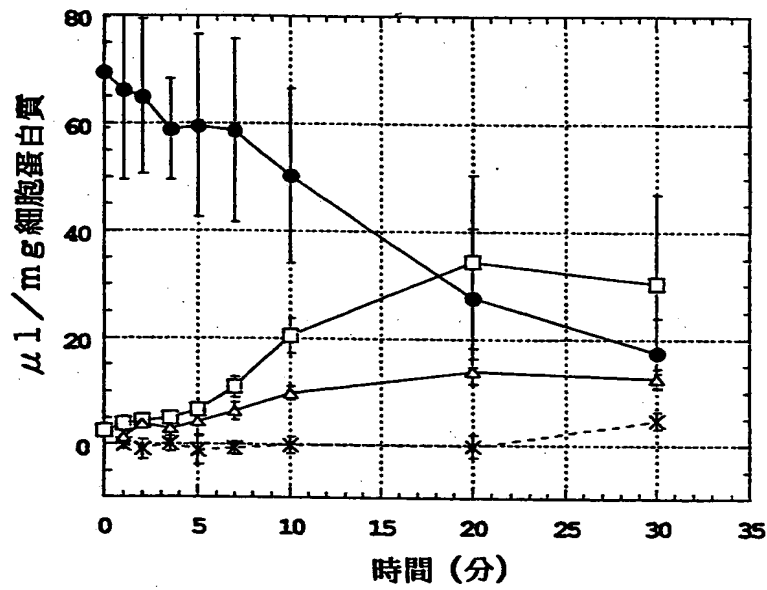
【図 1】



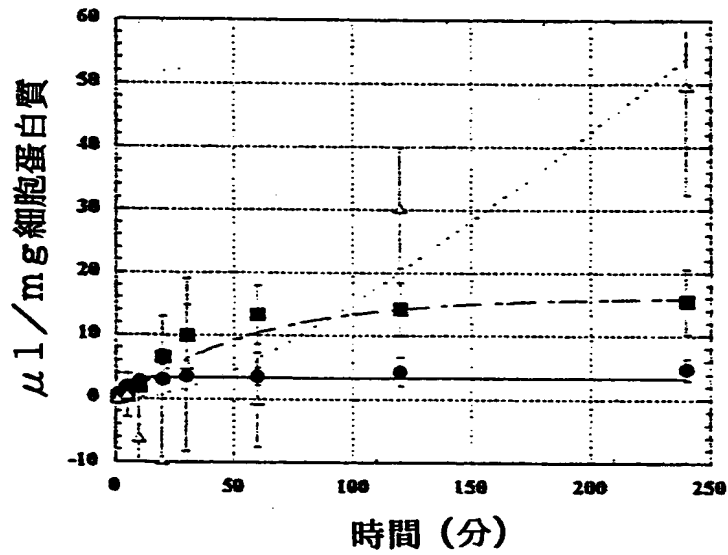
【図 2】



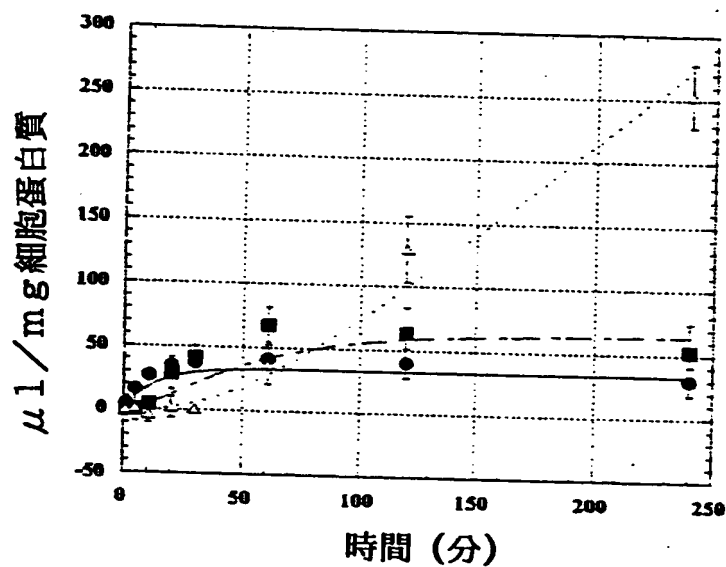
【図 3】



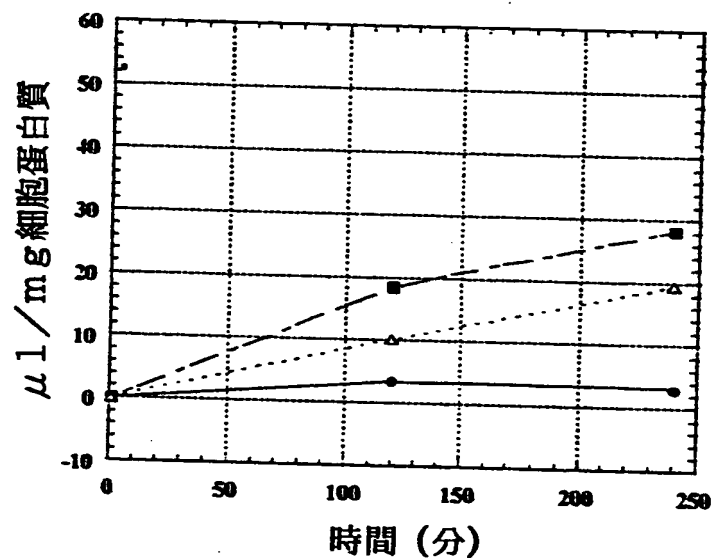
【図 4】



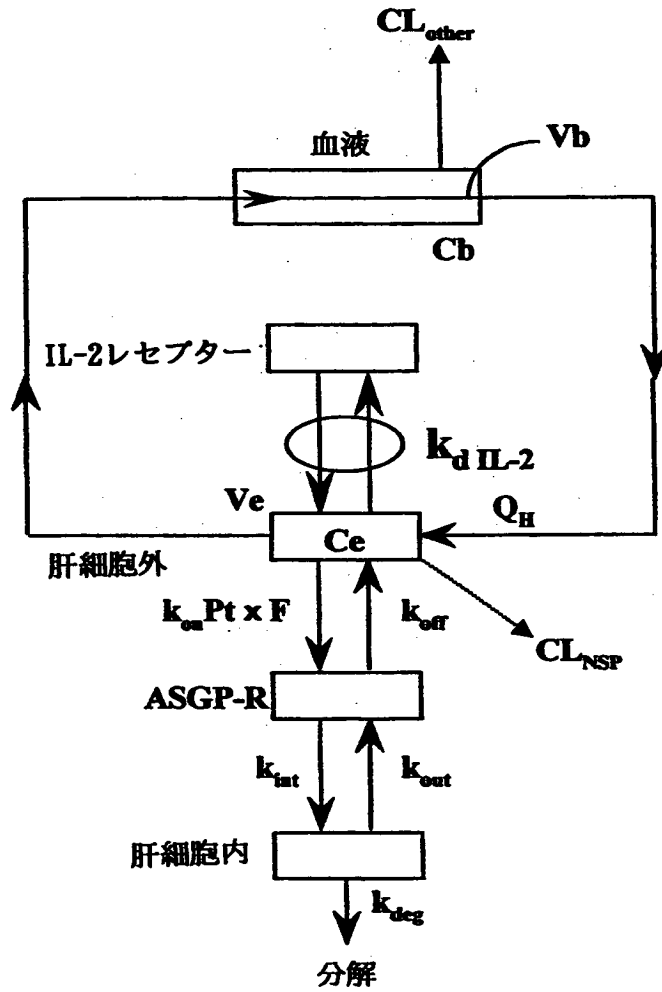
【図 5】



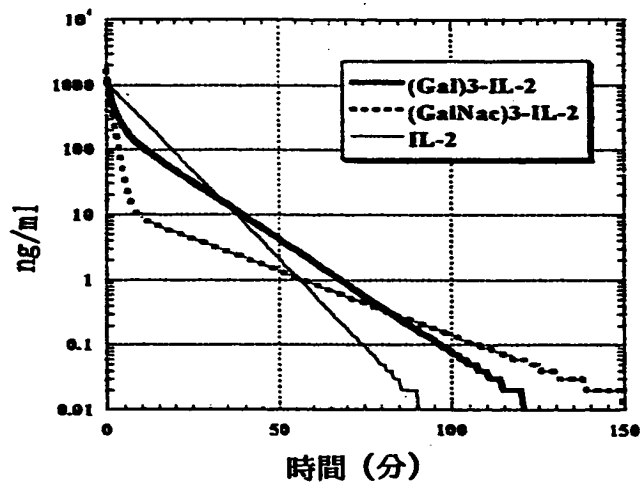
【図 6】



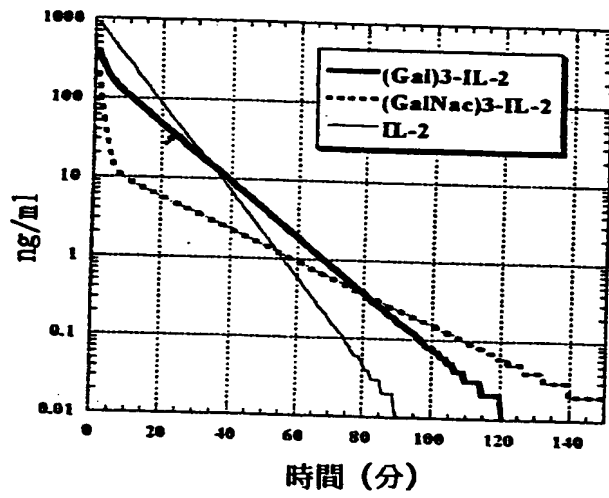
【図 7】



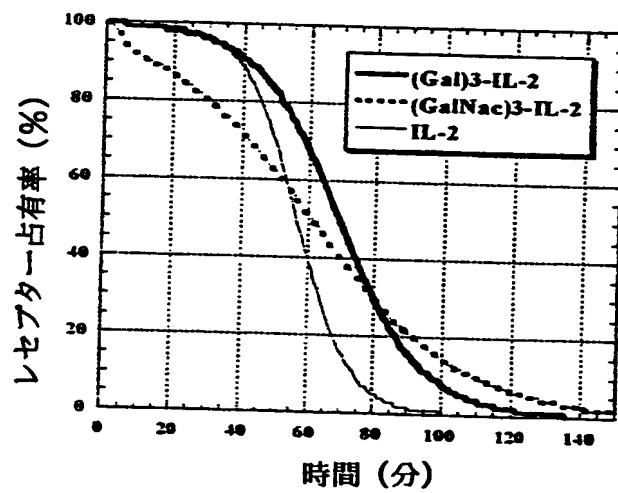
【図 8】



【図 9】

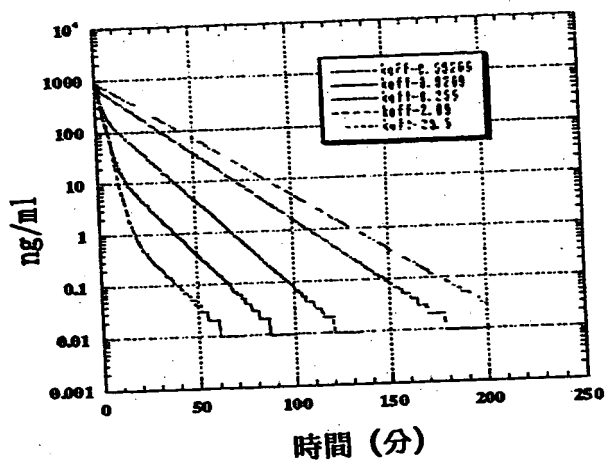


【図 10】

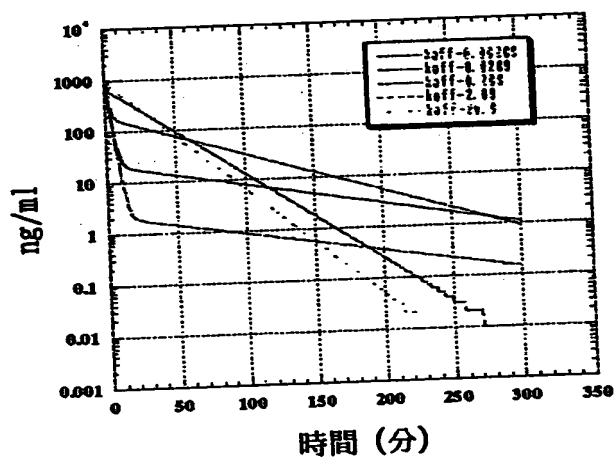


【図 11】

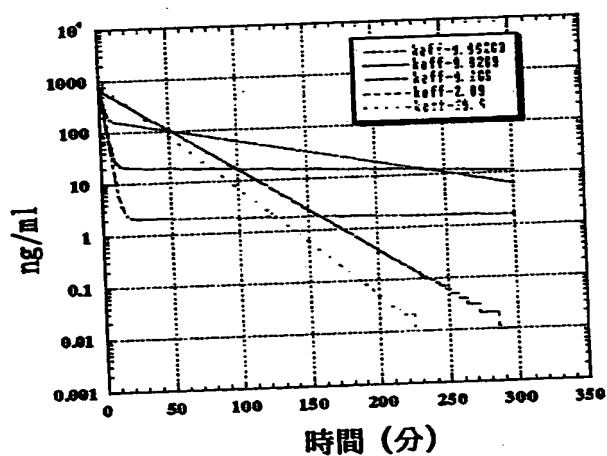
(A)



(B)



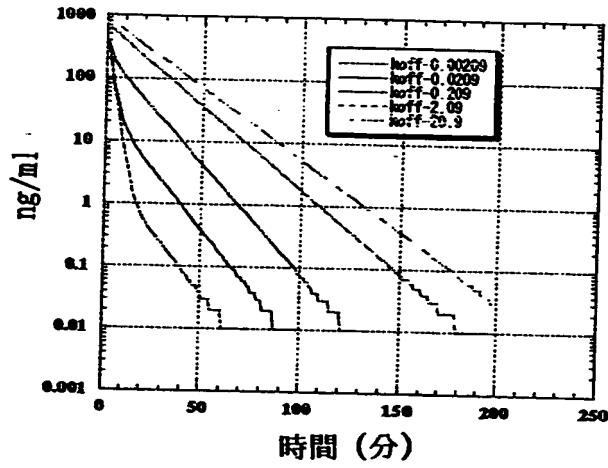
(C)



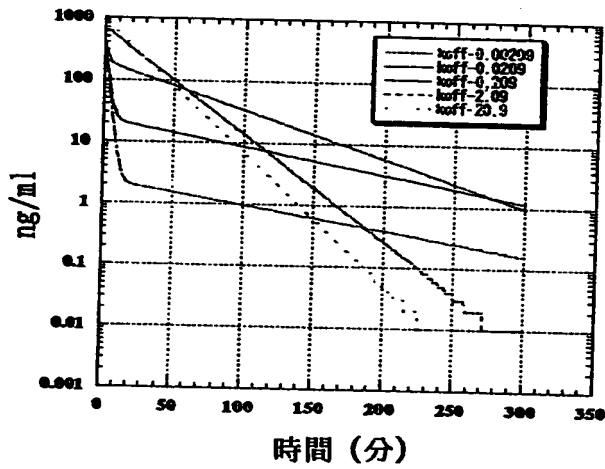


【図 12】

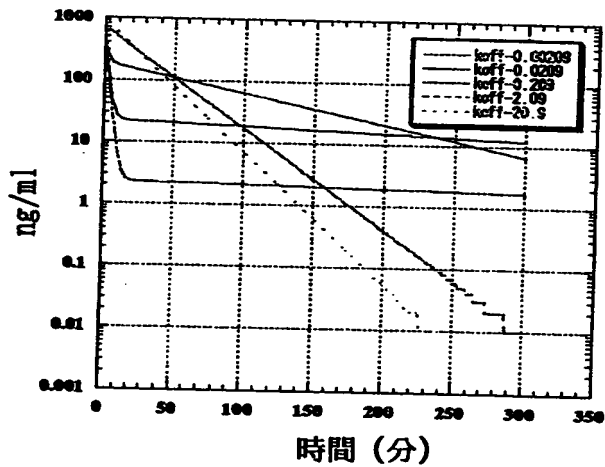
(A)



(B)

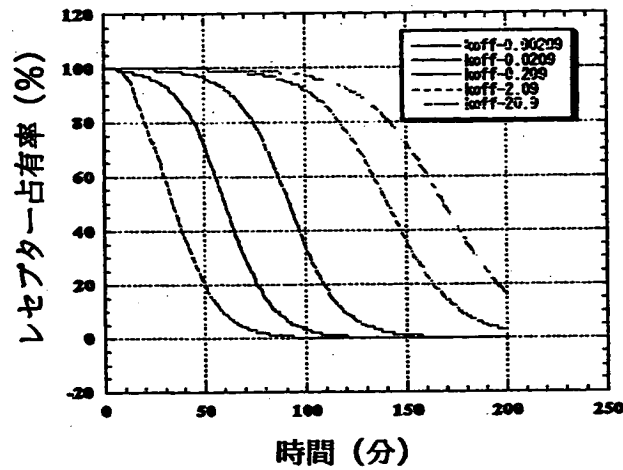


(C)

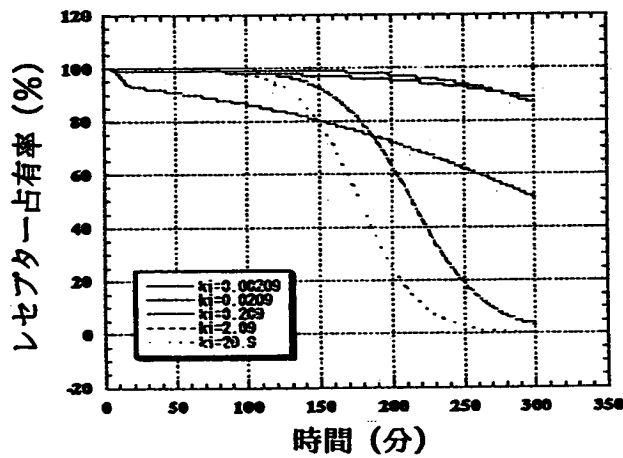


【図 13】

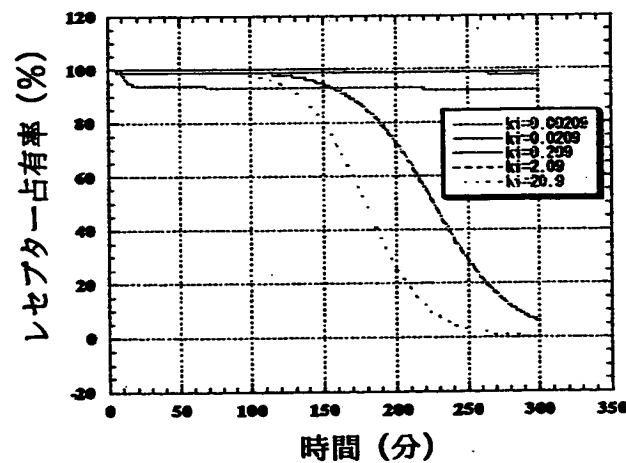
(A)



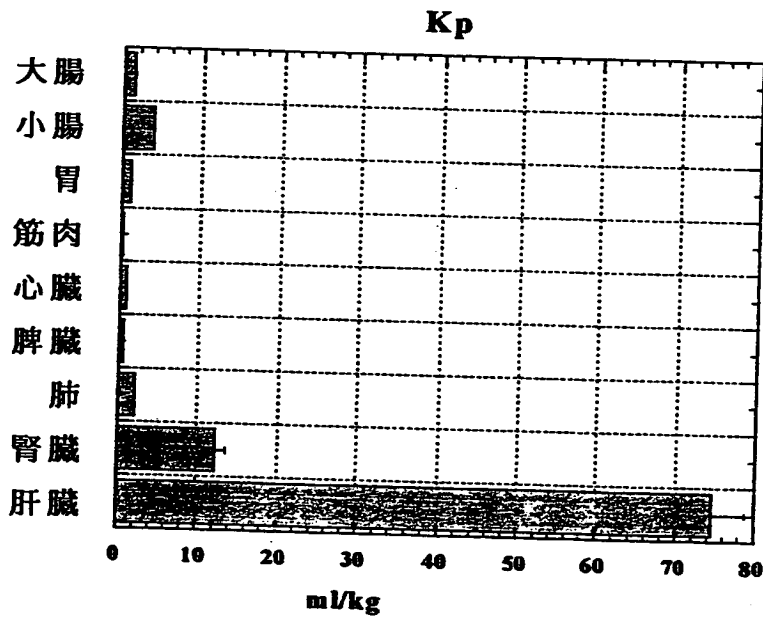
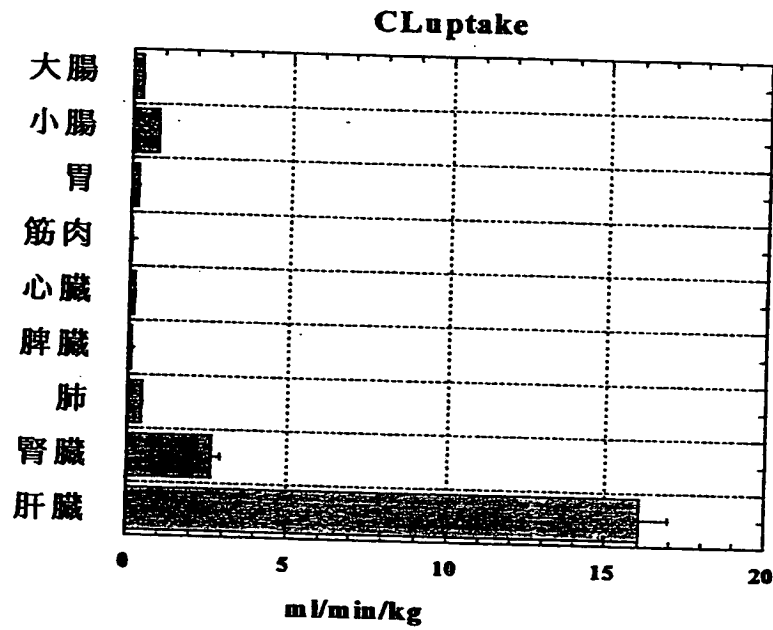
(B)



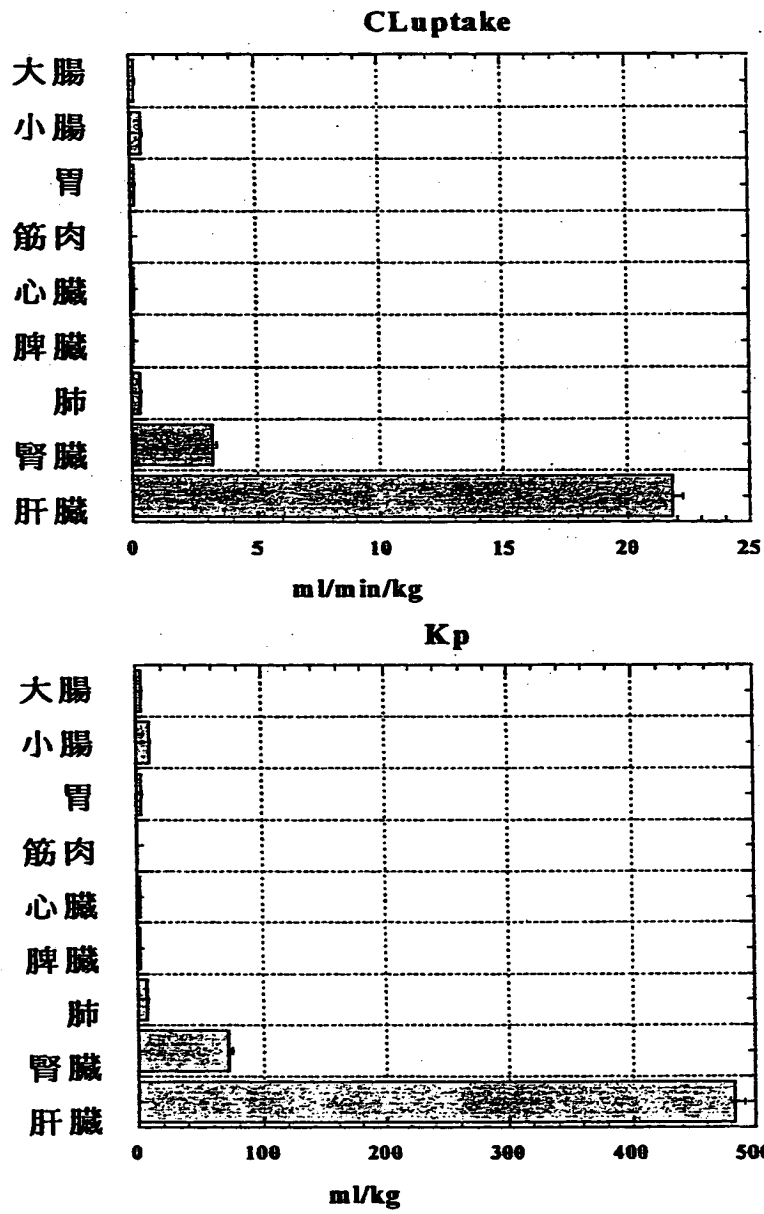
(C)



【図 1.4】



【図 15】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、全身投与後、ASGPRなどの細胞膜上の特定なレセプターへの結合親和性によってその周辺に集積させ、レセプターを介した内在化をできるだけ回避することにより標的組織に特異的に蓄積し得るリガンドの特性を把握し、当該リガンド特性を指標に、細胞内への内在化を回避できるリガンドをスクリーニングする方法を開発し、最適化されたりガンドを見出すことにある。さらに最適リガンドと生理活性蛋白質とを共有結合で結合させることにより、蛋白質のレセプター周辺への集積及び滞留を可能にする組織ターゲティング型DDS製剤を提供することにある。

【解決手段】 本発明は、標的組織に対するターゲティング型DDS製剤をスクリーニングする方法において、標的組織の細胞膜上に存在する特定のレセプターあるいは抗原等の蛋白質、例えばアシアロ糖蛋白質レセプター（ASGPR）に対する結合親和性を有するリガンド又は当該リガンドで修飾された物質を、当該レセプターへの結合を介した内在化回避能、例えば当該レセプターに対する解離速度定数（ $k_{off}$ ）と内在化速度定数（ $k_{int}$ ）との比（ $k_{off}/k_{int}$ ）、及び、結合親和性の強さを指標としてスクリーニングする方法ならびにそのリガンドと生理活性蛋白質あるいは低分子薬物との結合体であるレセプター周辺への集積、滞留能を有する医薬品組成物に関する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日

1991年 7月 2日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名

味の素株式会社